



Publication number: JP2006517198 T2

Publication country: JAPAN

Publication type: APPLICATION BASED ON INTERNAT. APPL.

Publication date: 20060720

Application number: JP20050509957T

Application date: 20031119

Priority: US20020299486 20021119 US20020299486 ; US20030441089 20030519 US20030441089 ; WO2003US36946 20031119 WO2003US36946 ;

International class⁸: C07K14/435 20060101 I C ; C07K14/47 20060101 I A ; A61B 20060101 I S ; A61B1/00 20060101 I C ; A61B1/00 20060101 I A ; A61K38/00 20060101 N C ; A61K38/00 20060101 N A ; A61P9/00 20060101 N C ; A61P9/00 20060101 N A ; A61P9/10 20060101 N A ; A61P25/00 20060101 N C ; A61P25/00 20060101 N A ; A61P35/00 20060101 N C ; A61P35/00 20060101 N A ; C07K16/18 20060101 I C ; C07K16/18 20060101 I A ; G01N33/53 20060101 I C ; G01N33/53 20060101 I A ; G01N33/563 20060101 I C ; G01N33/563 20060101 I A ; G01N33/74 20060101 I C ; G01N33/74 20060101 I A ;

European class: C07K16/26 ; G01N33/74 ;

Family members: AU2003295644 AA AU2003295644 AH CA2506668 AA CN101076730 A EP1578254 A2 EP1578254 A4 EP2109624 A1 JP2006517198 T2 JP4638350 B2 RU2005119179 A RU2359268 C2 US2004096987 AA US2004096990 AA US2007092916 AA US2007134746 AA US2007224186 AA US2010086945 AA US2010330595 AA US2011275099 AA US2011287448 AA US2012003696 AA US7320894 BB US7411048 BB US7649081 BB US7749713 BB US7998691 BB US8003338 BB US8017737 BB WO04058044 A2 WO04058044 A3 WO06089795 A1

Title: ヒトまたは動物の組織、血液もしくは体液中のヘプシジンをスクリーニングすることによる疾患の診断方法およびそのための治療的使用

Abstract:

本発明は、プロヘプシジンおよびそのフラグメントを含むヘプシジンタンパク質の非生理的レベルを特徴とする疾患状態を診断するための方法およびキットに関しており、この方法は、被験者から組織または液体サンプルを入手するステップと、このサンプルをヘプシジンタンパク質の中央部分またはC末端に対応するポリペプチドに特異的に結合するそれらの抗体またはそのフラグメントと接触させるステップと、抗体およびポリペプチドの結合に基づくアッセイを使用してヘプシジンレベルを定義するステップとを含み、ヘプシジンの非生理的レベルが疾患状態を表示する。本発明は、さらにまた例えばヘプシジンを過剰発現させる、またはダウンレギュレートするための遺伝子工学的アプローチにおける用途のための診断方法およびキットに関する。本発明は、さらにヘプシジンおよびヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いた被験者の治療による特定の疾患の治療的処置に関する。

The present invention is, and about methods and kits for diagnosing a disease state characterized by physiological levels of non-protein hepcidin protein, including fragments thereof Purohepushijin, the method includes the steps of obtaining a liquid sample or a tissue from subjects and the step of contacting the antibody or fragment thereof of those that bind specifically to a polypeptide corresponding to the C-terminus or central portion of the protein hepcidin protein the sample, using assays based on the binding of a polypeptide antibodies and comprises a step of quantifying the hepcidin level and disease status is non-physiological levels of hepcidin. The invention, for example, overexpression of hepcidin further relates to kits for use in diagnostic methods and approaches such as genetic engineering or to down-regulate. The present invention relates to a particular therapeutic treatment of disease by treatment of a subject for further agonist or antagonist of hepcidin and hepcidin.

Claims:

1. 非生理的レベルのヘプシジンにより疾患状態を診断する方法であって、前記方法は、被験者から組織または液体サンプルを入手するステップと、前記サンプルをヘプシジンの中央部分もしくはカルボキシル末端エピトープ1つ以上に特異的に結合する抗体もしくはそのフラグメントと接触させるステップと、前記サンプル中のヘプシジンレベルを定義するステップと、を含み、非生理的レベルのヘプシジンが前記疾患状態を表示する、方法。

1. A method of diagnosing a disease state by non-physiological levels of hepcidin, the method comprising the steps of obtaining tissue or fluid sample from the subject, or the carboxy-terminal epitope 1 sample above the central portion of hepcidin a step of contacting a fragment thereof antibody that binds specifically to one or more, a step to quantify hepcidin levels in the sample above, including a display a disease state wherein the hepcidin levels of non-physiological way.

2. 前記抗体がヘプシジンのアミノ酸 28 から 47 内に含有される中央部分エピトープに特異的に結合する、請求項 1 記載の方法。

3. 前記抗体がヘプシジンのアミノ酸 70 から 84 内に含有されるカルボキシ末端エピトープに特異的に結合する、請求項 1 記載の方法。

4. 前記定量ステップが、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ、サンドイッチアッセイ、沈降反応、ゲル免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光免疫法、タンパク質 A イムノアッセイおよび免疫電気泳動アッセイからなる群から選択されるアッセイを実施するステップを含む、請求項 1 記載の方法。

5. 非生理的レベルのヘプシジンにより疾患状態を検出するキットであって、前記キットは、ヘプシジンの中央部分もしくはカルボキシ末端エピトープ 1 つ以上に特異的に結合する抗ヘプシジン抗体もしくはそのフラグメントと、前記抗体もしくはそのフラグメントに直接的もしくは間接的に結合する試薬 1 種とを含む、キット。

6. 前記抗ヘプシジン抗体もしくはそのフラグメントが支持体上に固定される、請求項 5 記載のキット。

7. 前記試薬が第 1 結合分子と複合したヘプシジンを含む、請求項 5 記載のキット。

8. 第 1 結合分子がビオチンである、請求項 7 記載のキット。

9. 前記キットが、第 2 結合分子と複合した 1 種の酵素および前記酵素の基質をさらに含む、請求項 8 記載のキット。

10. 第 2 結合分子がストレプトアビジンである、請求項 9 記載のキット。

11. 前記酵素がホースラディッシュ・ペルオキシダーゼであり、前記基質が過酸化水素を含む、請求項 9 記載のキット。

12. ヘプシジンの中央部分もしくはカルボキシ末端エピトープ 1 つ以上に特異的に結合する抗体またはそのフラグメント。

13. 前記中央部分エピトープがヘプシジンのアミノ酸 28 から 47 内に含有されている、請求項 12 記載の抗体。

14. 前記カルボキシ末端エピトープがヘプシジンのアミノ酸 70 から 84 内に含有されている、請求項 12 記載の抗体。

15. 前記ヘプシジンがプロヘプシジン、ヘプシジンもしくはそのフラグメントを含む、請求項 1 記載の方法。

16. 前記ヘプシジンがプロヘプシジンを含む、請求項 1 記載の方法。

17. 前記ヘプシジンがプロヘプシジンもしくはヘプシジンを含む、請求項 5 記載のキット。

18. 前記ヘプシジンがプロヘプシジンを含む、請求項 5 記載のキット。

19. 前記ヘプシジンがプロヘプシジンもしくはヘプシジンを含む、請求項 12 記載のヘプシジン。

2. that binds specifically to an epitope contained within the central portion 28 of the 47 amino acid hepcidin antibodies, wherein the method of claim 1.

3. that specifically binds to an epitope contained within the carboxy-terminal 70 amino acid hepcidin antibodies to 84, wherein the method of claim 1.

4. wherein the step quantitative radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assay, sandwich assays, precipitin reactions, immunodiffusion assays, gel agglutination assays, immunofluorescence methods, selected from the group consisting of protein A immunoassays and immunoelectrophoresis assays including the step of carrying out the assay by the method of claim 1.

5. A kit for detecting a disease state by non-physiological levels of hepcidin, the kit is an anti-hepcidin antibody or a fragment thereof that binds specifically to the carboxy-terminal epitope 1 or more central part of the hepcidin, one and a reagent that binds directly or indirectly to the antibody or a fragment thereof, Kit.

6. that is fixed on a support anti-hepcidin antibody or fragment thereof, wherein the kit of claim 5.

7. including hepcidin molecule complexed with said first binding reagent kit of claim 5.

8. biotin-binding molecule is the first kit of claim 7.

9. that said kit further comprises an enzyme and the substrate of the enzyme in complex with one second binding molecule, the kit of claim 8.

10. a second binding molecule is streptavidin, a kit of claim 9.

11. and the enzyme horseradish peroxidase, peroxide-containing substrate, wherein the kit of claim 9.

12. fragment or antibody that binds specifically to the carboxy-terminal epitope 1 or more central part of hepcidin.

13. that is contained within amino acids 28 to 47 wherein the central portion of hepcidin epitope, the antibody of claim 12.

14. that is contained within 70 to 84 amino acid carboxy-terminal epitopes of hepcidin, wherein the antibody of claim 12.

15. Purohepushijin said that hepcidin, hepcidin or fragments thereof, including the method of claim 1.

16. Purohepushijin including the hepcidin, wherein the claim 1.

17. Purohepushijin including the hepcidin or hepcidin, wherein the kit of claim 5.

18. including Purohepushijin said that hepcidin, a kit of claim 5.

20. 前記ヘプシジンがプロヘプシジンを含む、請求項12記載のヘプシジン。

19. Purohepushijin including the hepcidin or hepcidin, wherein the hepcidin claim 12.

20. including Purohepushijin said that hepcidin, hepcidin claim 12.

Description:

[0001] 関連出願の相互参照 本出願は、2002年11月19日に出願された特許出願第10/299,486号の一部継続出願である、2003年5月19日に提出された特許出願第10/441,089号の一部継続出願である。

[0001] cross-reference to related applications The present application is filed patent application No. 10/299 November 19, 2002, is a continuation-in-part application No. 486 Patent Application No. 10/441, filed May 19, 2003, No. 089 is a continuation-in-part application.

[0002] 鉄は、全ての生体組織の成長および発達にとって不可欠の必須微量元素である。鉄は、DNA合成や広範囲に及ぶ代謝工程にとって欠くことができない。しかし、鉄代謝の障害は、鉄欠乏性貧血、ヘモジデリン沈着症、または鉄過剰性疾患であるヘモクロマトーシスを含むがそれらに限定されない、多数の重大な哺乳動物の疾患に関連があるとされてきた (Pietrangelo, A. (2002) *Am J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G403-414; Andrews, N. C. (2000) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 75-98; Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Anderson and Powell (2002) *Int J Hematol* 76, 203-203; Beutler et al., (2001) *Drug-Metab. Dispos.* 29, 495-499)。生理的条件下では、ヒトの鉄含量は吸収を制御することによって調節される。哺乳動物では、鉄吸収は主として十二指腸および上部空腸において発生し、それにより鉄の貯蔵が生理的に制御される唯一のメカニズムである (Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001)。吸収された後、鉄は循環中トランスフェリンに結合し、身体全体の組織へ送達される。鉄貯蔵の主要部位である肝臓では、トランスフェリンに結合した鉄は伝統的なトランスフェリン受容体 (TfR1) (Collawn et al., (1990) *Cell* 63, 1061-1072) を介し、またおそらくより多くの量は、近年同定された同種トランスフェリン受容体2 (TfR2) (Kawabata et al., (1999) *J Biol Chem* 274, 20826-20832) を介して、受容体媒介性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。このタンパク質の細胞外ドメインは、TfR1の対応する部分と45%同一である (Id.)。TfR2は、さらにまたトランスフェリンに結合して鉄の取り込みを促進することもできる。TfR2における突然変異は、鉄ホメオスタシスにおけるTfR2の重要な役割を示す特定の形態のヘモクロマトーシスと関連付けられてきた (Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Camasehella et al., (2000) *Nat. Genet.* 25, 14-15; Fleming et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10653-10658)。TfR2は主として肝臓内で発現するが (Fleming et al., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2214-2219; Subramaniam et al., (2002) *Cell Biochem. Biophys.* 36, 235-239)、正確な細胞局在はいまだ不明である。

[0002] Iron is an essential trace element essential for growth and development of all living tissue. Iron is indispensable for the process of synthesis and metabolism of a wide range of DNA. However, the failure of iron metabolism, iron deficiency anemia, hemosiderosis, without limitation, including but hemochromatosis is a disease of iron overload, or is considered to be related to disease in mammals significant number of have (Pietrangelo, A. (2002) *Am J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G403-414; Andrews, N.C. (2000) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 75-98; Philpott, C.C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Anderson and Powell (2002) *Int J Hematol* 76, 203-203; Beutler et al., (2001) *Drug-Metab. Dispos.* 29, 495-499). Under physiological conditions, the iron content in humans is regulated by controlling absorption. In mammals, iron absorption occurs primarily in the duodenum and upper jejunum, which is the only mechanism that is controlled by physiological iron stores it (Philpott, C.C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001.) Once absorbed, iron is bound to circulating transferrin is delivered to tissues throughout the body.

[0003] 鉄欠乏性である個体では鉄吸収を強化するフィードバック機構が存在するが、鉄過剰であるヒトでは鉄吸収が減少する (Pietrangelo, A. (2002) *Am J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G403-414; Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Anderson and Powell (2002) *Int J Hematol* 76, 203-203)。しかし遺伝性ヘモクロマトーシス (HH) では、この調節機構が損傷していると思われる。鉄過剰にもかかわらず、食事から吸収される鉄の量が上昇し、内臓中の過剰な鉄の蓄積を引き起こし、内臓障害および機能不全を生じさせる。腸が身体の鉄要求量変化に対応する分子機構に関しては十分に理解されていない。これに関連して、近年同定された哺乳動物ペプチドであるヘプシジン (Krause et al., (2000) *FEBS Lett* 489, 147-150; Park et al., (2001) *J Biol Chem* 276, 7806-7810) は、鉄ホメオスタシスを調節する重要なシグナリング成分であると予測される (Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Nicola et al., (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4596-4601)。

[0004] ヘプシジンは、主として肝臓で産生する、システインに富む小さなペプチドである。この分子は、腸内の鉄の吸収を調節し、マクロファージからの鉄の遊離を阻害する。ヘプシジンは最初に、抗菌活性を示すヒト血漿および尿中で25アミノ酸(aa)ペプチドとして単離された(Krause et al. (2000) FEBS Lett 489, 147-150; Park et al. (2001) J Biol Chem 276, 7806-7810)。引き続いて、鉄によって調節された肝特異的遺伝子を探索して、マウスにおける83aa前駆体ならびにラットおよびヒトにおける84aa前駆体をコードするヘプシジンcDNAが同定された(Pigeon et al. (2001) J Biol Chem 276, 7811-7819)。ヒトヘプシジンのcDNA構造は、ヒトヘプシジンが84アミノ酸プレプロペプチドとして翻訳され、アミノ末端で60アミノ酸残基プロヘプシジンペプチドへプロセッシングされ、さらに25アミノ酸ヘプシジンペプチドにプロセッシングされることを示唆している(Park et al. (2001))。

[0005] ヘプシジンの発現は、hfe-/-マウスにおいて見いだされる表現型と同一の表現型に似ている上流刺激因子2(Usf2)遺伝子の標的破壊に起因する鉄過剰を示すマウスでは無効にされ(Nicolas G, et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 8780-8785)、このペプチドが鉄代謝において極めて重要な役割を果たすという結論を導く。これとは対照的に、ヘプシジンの過剰発現はトランスジェニックマウスにおいて重度の鉄欠乏性貧血を生じさせることが証明されており(Nicolas et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 4596-4601)、これはヘプシジンが鉄ホメオスタシスの主要な調節因子であることを示している。さらに、近年の研究は、hfeノックアウトマウスでは肝ヘプシジン発現が減少し(Ahmad et al. (2002) Blood Cells Mol Dis 29, 361-366)、ヘプシジンペプチドにおける突然変異には重度の若年性ヘモクロマトーシスが関連している(Roetto et al. (2003) Nat Genet 33, 21-22)ことを示しており、鉄過剰の分子病因論の理解において新しい展望を開いてきた。しかし、ヘプシジンが身体内鉄貯蔵のバランスを取る、または生理的状態および病理的状態において食事性鉄吸収を調整する機構はまだ同定されていない。

[0006] この点で、このペプチドの細胞局在および様々な鉄の状態の調節は、ヘプシジン機能の研究において極めて重要である。様々な器官中のヒトおよびマウスヘプシジンmRNAレベルについてのノーザンブロット分析により、ヘプシジンは主として肝臓内で発現することが明らかになった(Krause et al. (2000) FEBS Lett 489, 147-150; Park et al. (2001) J Biol Chem 276, 7806-7810; Nicolas et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 4596-4601)、このペプチドの細胞局在に関するデータは存在していない。

[0007] 本発明は、ヘプシジンによる哺乳動物細胞の鉄取り込みの調節ならびに鉄代謝の障害に関係する疾患の診断におけるヘプシジンおよび/またはヘプシジン特異的抗体の使用に関する。本発明の診断用検出キットは、ヒトまたは動物いずれかの全集団のスクリーニングおよびこれらの疾患を有する被験者を同定する際に特に有用なことがある。

[0008] 本発明の1つの態様は、非生理的レベルのヘプシジンの特徴とする疾患状態を診断するための方法であって、前記方法は、被験者から組織もしくは液体サンプルを入手するステップと、このサンプルをヘプシジンの中央部分(アミノ酸20から50)またはC末端(アミノ酸65から84)からのポリペプチドに特異的に結合する抗体もしくはそのフラグメントと接触させるステップと、抗体およびポリペプチドの結合に基づくアッセイを使用してヘプシジンレベルを定量化するステップとを含み、非生理的レベルのヘプシジンが疾患状態を表示する。本発明の1つの態様では、ヒト血漿中のプロヘプシジンの検出を可能にする高感受性の診断方法およびキットが確立された。本発明は、上記で言及した疾患の治療中および治療後の進行のパラメーターとしてのヘプシジンを測定するためにヘプシジン抗体ならびに診断方法およびキットを使用できる、広範囲の治療上の展望を開く。

[0009] 本発明の1つの実施形態は、プロヘプシジンおよびそのフラグメントを含むヘプシジンタンパク質の生成および精製に関する。本発明のまた別の実施形態は、ヘプシジン特異的抗体、またはそれらのフラグメントもしくは変異体に関し、それらは順に、疑わしいヒトまたは動物においてプロヘプシジンを含むヘプシジンタンパク質を検出するためのイムノアッセイに使用できる。

[0010] 本発明のまた別の態様では、ヘプシジンによる診断方法およびキットは、例えばヘプシジンを過剰発現させる、またはダウンレギュレートするためのような遺伝子工学的アプローチに使用できる。

[0011] 本発明のさらにまた別の態様では、ヘプシジンは、ヘプシジン、およびヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて患者を治療することによって、本明細書に記載の疾

in the liver is the major site of iron storage, iron bound to transferrin, transferrin receptor traditional (TfR1) (Collawn et al. (1990) Cell 63,1061-1072) through a greater amount is probably also two recently identified homologous transferrin receptor (TfR2) (Kawabata et al. (1999) J Biol Chem 274,20826-20832) through is taken up into cells by receptor-mediated endocytosis. Extracellular domain of this protein is 45 percent identical to corresponding parts of the TfR1 (Id.). TfR2 can also facilitate the uptake of ferric iron bound to transferrin further. Mutations in TfR2, has been associated with a particular form of hemochromatosis, indicating the important role of TfR2 in iron homeostasis (Philpott, C.C. (2002) Hepatology 35,993-1001; Camasehella et al., (2000) Nat.Genet.25,14-15; Fleming et al., (2002) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99,10653-10658). TfR2 is expressed primarily in the liver (Fleming et al., (2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97,2214-2219; Subramaniam et al., (2002) Cell Biochem.Biophys.36, 235 - 239), the exact cellular localization is still unknown.

[0003] in individuals who are iron deficient, but there is a feedback mechanism to enhance iron absorption, iron overload in humans is a decrease iron absorption (Pietrangeli, A. (2002) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282, G403-414; Philpott, C.C. (2002) Hepatology 35,993-1001; Anderson and Powell (2002) Int J Hematol 76,203-203). However, hereditary hemochromatosis (HH) in, believe that this regulatory mechanism has been damaged. Despite iron overload, increased the amount of iron absorbed from the diet, causing accumulation of excess iron in internal organs, causing dysfunction and visceral involvement. About the molecular mechanisms that

患の治療的処置に使用できる。細胞中への鉄取り込みは、ヘプシジンの濃度を変化させ、鉄または T f R 2 受容体へのヘプシジンの結合を阻害することによって調整できよう。したがって、ヘプシジン、およびヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストは鉄代謝の障害が存在する状態の治療において有用な可能性がある。例えば、そのような物質は上記の疾患などの治療において有用なことがある。

[0012] 本発明のこれらやその他の態様は、以下の図面および詳細な説明を参照することによってより明解に理解されるであろう。

[0013] 本発明では、ヘプシジンが哺乳動物細胞による鉄取り込みを調節すること、そしてヘプシジンの非生理的発現が鉄代謝の分布に関係する疾患を生じさせることについて記載する。本明細書で使用する用語「ヘプシジン」は、プロヘプシジン、ヘプシジン、もしくはそのフラグメントを意味する。血液中のヘプシジンの生理的濃度は、約 50 から約 150 ng / mL の範囲内である。非生理的濃度はこの範囲より下方または上方である。非生理的量のヘプシジンはタンパク質もしくはそのフラグメントは、鉄欠乏性貧血などの鉄欠乏症または過剰を生じさせる鉄代謝の障害、ヘモジリン沈着症およびヘモクロマトーシスもしくは続発性ヘモクロマトーシス、セロプラスミン欠乏症、低トランスフェリン血症、無トランスフェリン血症などの遺伝性および非遺伝性鉄過剰疾患、不確定原因の鉄過剰疾患、例えば胆管系の疾患、肝疾患、特にアルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪肝炎、ならびに慢性 B 型および C 型肝炎感染症、鉄芽球性貧血、サラセミアなどの鉄を利用する疾患、白血病、赤血球増加症、大赤血球性、小赤血球性もしくは正赤血球性貧血、網状赤血球増加症を伴う貧血、溶血性貧血などの血液学的疾患、感染症および疾患に起因する細網内皮系の障害、炎症および敗血症を含む感染症、癌、肉腫、リンパ腫などの非生理的ヘプシジン濃度を生じさせる免疫学的疾患および腫瘍、アルツハイマー病およびウィルソン病などの神経変性疾患と関連している。この発見によって、ヘプシジンタンパク質およびそのフラグメントについてのアッセイの開発、それに続くそれらの天然の構成および生理的活性を保持しながらの精製が可能になった。本発明は、一部には、ある種の障害に罹患している患者においてはヒトまたは動物の組織、血液および体液中にヘプシジンタンパク質が存在するという発見に基づいている。

[0014] 本発明は、これらの障害の患者におけるプロヘプシジンを含むヘプシジンタンパク質がヒトまたは動物の組織、血液および体液において、これらの障害の患者ではない正常なヒトまたは動物の組織、血液および体液において見いだされる濃度を大きく超える濃度で存在するという最初の証明を提供する。これは、患者からの組織、血液もしくは体液のサンプルを検査するステップと、ヘプシジンタンパク質および / またはプロヘプシジンの存在および量を検出するステップと、によって達成される。本発明による、組織、血液もしくは体液中のプロヘプシジンもしくはそのフラグメントを含むあらゆるヘプシジンタンパク質の検出および定量的測定は、罹患患者において本明細書に記載の疾患の臨床的診断を裏付け、またその疾患の経過を追跡する際に有用である。本発明は、そのような疾患を安定化させる、そのような疾患の発生を減少させる、または予防するという能力について検査される薬剤を用いた治療の期間中およびそれに続く期間にその疾患をモニタリングする際にも有用である。

[0015] 説明する目的でのみ、本発明を、(a) プロヘプシジンもしくはそのフラグメントを含むヘプシジンタンパク質を生成するステップ、(b) プロヘプシジンもしくはそのフラグメントを含むヘプシジンタンパク質に特異的に結合する抗体を生成するステップ、(c) 本明細書に記載の疾患の亜型を診断する、またはモニタリングするための診断アッセイおよびキット、(d) ヘプシジンもしくはプロヘプシジンを過剰発現させる、およびダウンレギュレートする方法、および (e) 本明細書に記載の疾患の治療に関して記載する。

[0016] 本発明の 1 つの態様では、本出願人らは生理的状態および関連疾患においてヘプシジンが果たす役割を決定する方法を提供する。本発明のまた別の態様では、本出願人らはヘプシジン前駆体分子の中央部分および C 末端に対する特異的抗体を提供する。本発明のこの態様では、これらの抗体を使用してヒトおよびモルモット肝中のヘプシジンの細胞局在が明示された。HH、慢性腎不全 (CRI) および腎性貧血 (RA) を有する患者のヒト血清中のプロヘプシジンを検出する高感受性 ELISA を確立した。本出願人らは、プロヘプシジンが肝細胞側底膜を越えて血液中へ遊離させられ、腎排泄を受けることを記載してきた。ヘプシジンの血清中レベルは HH および慢性 RA では顕著にダウンレギュレートされるので、ヘプシジンはこれらの疾患の病態生理において何らかの役割を果たすはずである。

[0017] ヘプシジンタンパク質の産生 血液および体液からのヘプシジンタンパク質の単離 本発明のために、用語「ヘプシジンタンパク質」は、Pigeon and co-workers (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819) によって発表された予測アミノ酸配列と約 80 % のアミノ酸配列同一性を共有する哺乳動物ヘプシジンポリペプチドであると定義されている。本明細書で提供するヘプシジンタンパク質には、プロヘプシジン、ヘプシジンおよびそのフラグメントが含まれる。本明細書で提供するヘプシジンタンパク質には、さらにまた精製ヘプシジンタンパク質に類似するがその修飾が自然に

respond to changes in body iron demand in the intestine is not understood fully. In relation to this, the mammalian peptide hepcidin has been identified recently (Krause et al. (2000) FEBS Lett 489, 147-150; Park et al. (2001) J Biol Chem 276, 7806-7810), the expected to be important signaling components that regulate iron homeostasis (Philpott C.C. (2002) Hepatology 35, 993-1001; Nicolas et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 4596-4601).

[0004] Hepcidin is primarily produced by the liver, small cysteine-rich peptides. This molecule regulates iron absorption in the intestine, which inhibits the release of iron from macrophages. Hepcidin first 25 amino acids in human plasma and urine exhibit antimicrobial activity (aa) was isolated as a peptide (Krause et al. (2000) FEBS Lett 489, 147-150; Park et al. (2001) J Biol Chem 276, 7806-7810). Subsequently, to explore the liver-specific genes regulated by iron, hepcidin has been identified in the cDNA encoding the human precursor and 84aa 83aa precursor in mice and rats (Pigeon et al. (2001) J Biol Chem 276, 7811-7819). CDNA structures of Hithopepushijin is translated as 84 amino acid prepro-peptide Hithopepushijin is processed to pro-hepcidin residue peptide 60 amino acids at the amino terminus, which suggests that the processing of 25 amino acid hepcidin peptide addition (Park et al. (2001)).

[0005] expression of hepcidin, hfe-/- 2 upstream stimulating factor phenotype similar to that found the same phenotype in mice (Usl2) caused by targeted disruption of the gene iron overload in mice show that has been disabled (Nicolas G, et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 8780-8785), leads to the conclusion that play a critical role for this peptide in iron

提供される、または意図的に組換え作製されるアミノ酸配列を特徴とするタンパク質が含まれる。例えば、当業者であれば、公知の技術を使用してヘプシジンペプチドまたはDNA配列を修飾することができる。ヘプシジンタンパク質配列における当該の修飾には、コーディング配列中の選択されたアミノ酸残基の変更、置換、取替え、挿入または欠失が含まれてよい。例えば、分子の立体配座を変化させるために1つ以上のシステイン残基が欠失してよい、または他のアミノ酸と取り替えられてよい。そのような変更、置換、取替え、挿入または欠失のための技術は当業者には周知である（例えば、米国特許第4,518,584号を参照）。好ましくは、そのような変更、置換、取替え、挿入または欠失は、そのタンパク質の所望の活性を保持する。タンパク質機能にとって重要であるヘプシジンタンパク質の領域は、一本鎖もしくは二本鎖アミノ酸とアラニンとの系統的置換、およびその後の結果として生じたアラニンを含有する変形を生物活性について検査することによるアラニンスキャン法を含む、当分野において知られている様々な方法によって決定できる。このタイプの分析は、生物活性における1つ以上の置換アミノ酸の重要性を決定する。

[0018] ヘプシジンタンパク質の産生は、当業者には知られている標準技術を使用して、ヘモクロマトーシス、鉄欠乏性貧血、ヘモジリン沈着症、肝硬変およびその他の本明細書に記載の疾患に罹患しているヒトまたは動物の組織、血液もしくは体液からヘプシジンタンパク質を単離するステップによって遂行できる。本発明に含まれるそのような技術は、さらにまた適切な培地中での宿主細胞の培養を増殖させるステップと、細胞またはその中で細胞が増殖する培養からヘプシジンタンパク質を精製するステップとを含む、ヘプシジンタンパク質を産生する方法に関する。

[0019] 当分野において知られている様々な方法を利用すると、本発明の単離ヘプシジンタンパク質のいずれか1つを入手できる。例えば、ヘプシジンタンパク質は、さらにまた、ヘプシジンタンパク質をコードするcDNAをクローニングおよびシーケンシングすることによって予測されるように、ヘプシジンタンパク質のアミノ酸配列の化学合成（Pigeon et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819）によって産生することもできる。このヘプシジンタンパク質配列情報を利用すると、当分野において知られている標準ペプチド合成方法を使用して化学合成されるヘプシジンタンパク質のフラグメントの適切なアミノ酸配列を予測することができる。これらの方法には、R. Bruce Merrifield, (Erickson and Merrifield, [Solid-Phase Peptide Synthesis], in The Proteins, Volume 2, H. Neurath & R. Hill (Eds.) Academic Press, Inc., New York pp. 255-257; Merrifield, (1986) [Solid phase synthesis], Science, 242: 341-347) によって考案された固相法が含まれる。固相法では、アミノ酸がポリスチレンビーズなどの不溶性マトリックスに結合している増殖中のペプチド鎖へ段階的に添加される。この方法の主要な利点は、各段階の所望の生成物が急速に濾過かつ洗浄できるビーズに結合させられる点であり、このため中間物を精製する必要が回避される点である。これらの反応は全てが単一容器中で実施されるので、生成物の反復輸送に起因する損失が排除される。この化学的ペプチド合成の固相法は容易に自動化できるので、約50残基を含有するペプチドを良好な収率および純度で日常的に合成することが実行可能になる（Stewart and Young, (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chemical Co.; Tam et al., (1983) J. Am. Chem. Soc., 105: 6442）。例えば、図9に示したアミノ酸残基1から50、または34から84に対応するヘプシジンタンパク質フラグメントを合成できよう。最も単純なレベルでは、ヘプシジンタンパク質の小ペプチドおよびフラグメントを産生するためには、市販で入手できるペプチド合成装置が特に有用である。フラグメントは、例えば天然ヘプシジンタンパク質に対する抗体を生成する際に有用である。

[0020] 当業者は、タンパク質を単離する公知の方法にしたがって本発明の単離ヘプシジンタンパク質の1つを容易に入手することができる。これらの方法には、イムノクロマトグラフィー、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびイムノアフィニティクロマトグラフィーが含まれるが、それらに限定されない。例えば、Scope, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag (1994); Sambrook, et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい。

[0021] 最後に、ヘプシジンタンパク質をさらに精製するためには、例えばペンダントメチル基もしくは他の脂肪族基を有するシリカゲルなどの疎水性RP-HPLC媒質を使用する1つ以上の逆相高性能液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）ステップを使用できる。実質的に均質な単離組換えヘプシジンタンパク質を提供するためには、上記の精製ステップの一部または全部を様々な組み合わせで使用することができる。このように精製したヘプシジンタ

metabolism. This is in contrast, overexpression of hepcidin has been proven to cause severe iron deficiency anemia in transgenic mice (Nicolas et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99,4596-4601), which indicates that the major regulator of hepcidin on iron homeostasis. In addition, recent studies in the hfe knockout mice decreased liver hepcidin expression (Ahmad et al. (2002) Blood Cells Mol Dis 29,361-366), a mutation in the peptide hepcidin in severe juvenile Hemochromatosis associated with the Shisu (Roetto et al. (2003) Nat Genet 33,21-22) have shown that has opened up new horizons in understanding the molecular pathogenesis of iron overload. However, balancing the body iron stores in the hepcidin, a mechanism for adjusting the dietary iron absorption and in pathological conditions or physiological state has not yet been identified.

[0006] In this regard, the regulation of iron and various states of cellular localization of this peptide is very important in the study of functional hepcidin. Northern blot analysis for human and mouse hepcidin mRNA levels in various organs, revealed that hepcidin is expressed primarily in the liver (Krause et al. (2000) FEBS Lett 489,147-150; Park et al. (2001) J Biol Chem 276,7806-7810; Nicolas et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99,4596-4601), data on cellular localization of this peptide is not present.

[0007] The present invention relates to the use of hepcidin specific antibodies and / or disorders related to hepcidin in the diagnosis of disorders of iron metabolism and the regulation of iron uptake in mammalian cells by hepcidin. Detection kits for diagnosis of the present invention, may be particularly useful in identifying subjects with

ンパク質には実質的に他の哺乳動物タンパク質が含まれておらず、本発明によって単離タンパク質であると定義されている。

[0022] ヘプシジタンパク質の配列は、タンパク質シーケンシングのEdman分解法を使用して同定できる。この方法は、クロマトグラフィー法による引き続いての配列同定法のためにペプチドのアミノ末端から1回に1つのアミノ酸残基を連続的に除去する。例えば、Königsberg and Steinman, (1977) *Strategy and Methods of Sequence Analysis*, in Neurath and Hill (eds.), *The Proteins* (3rd ed.) Vol. 3, pp. 1-178, Academic Pressに記載された技術を参照されたい。さらに、ヘプシジタンパク質の配列分析は、(Hewick et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256: 7990-7997; Stein and Undefried, (1984) *Analy. Chem.*, 136: 7-23)に記載された技術にしたがった自動液相アミノ酸シークエネーターを使用して加速することができ、それによってピコモル量のヘプシジタンパク質の分析が可能になる。

[0023] 精製ヘプシジタンパク質は、ヘプシジタンパク質に結合する分子を同定するために、当分野において周知のインビトロ結合アッセイに使用できる。これらの分子には、例えば小分子、コンビナトリアルライブラリーからの分子、抗体またはその他のタンパク質が含まれるが、それらに限定されない。結合アッセイで同定された分子は、次に当分野において周知のインビトロ組織培養または動物モデル中でのアゴニストまたはアンタゴニスト活性について検査される。手短には、分子は複数の細胞培養または動物中で滴定され、次に動物/細胞の細胞死/動物死または長期生存のいずれかについて検査される。

[0024] さらに、結合分子は例えばリシンもしくはコレラ菌などの毒素、または細胞にとって毒性である他の化合物と複合している場合がある。毒素結合分子複合体は次に、ヘプシジタンパク質に対する結合分子の特異性によって腫瘍または他の細胞を標的とされる。

[0025] 組換えヘプシジタンパク質のクローニングおよび発現 他の実施形態では、ヘプシジタンパク質の産生は組換えDNA工芸技術によって達成できる。例えば、適切なヘプシジタンクレーオチドのコーディング配列は、適切な宿主細胞中で合成する、クローニングする、および発現させることができる。ヘプシジタンパク質をコードするDNA配列は知られているので(Pigeon et al., (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 7811-7819)、ヘモクロマトーシス、鉄欠乏性貧血、ヘモジリン沈着症、肝硬変および本明細書に記載の他の疾患に罹患しているヒトまたは動物患者由来の肝組織から調製したcDNAライブラリーを特定のヘプシジタンパク質cDNAについてスクリーニングするためのDNAプローブは、当分野において知られている標準方法によって合成することができる。これらのDNAプローブはさらに、当業者には周知の方法を使用してこれらのcDNAライブラリーからヘプシジタンパク質遺伝子の全ファミリーを単離するために使用できる。例えば、Maniatis et al., (1982) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., Chapter 7に記載された技術を参照されたい。

[0026] ハイブリダイゼーション方法は、標識化混合合成オリゴヌクレオチドプローブを使用することによる組換えクローンのスクリーニングのために有用であり、各プローブは、潜在的に、変性二本鎖DNAの非均質混合物を含有するハイブリダイゼーションサンプル中の特異的DNA配列の完全相補体である。そのようなスクリーニングのために、ハイブリダイゼーションは好ましくは一本鎖DNAまたは変性二本鎖DNAのどちらかについて実施される。非特異的結合を回避するように向けられたストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を使用することによって、例えば、その完全相補体である混合物中のその一本鎖プローブに対する標的DNAのハイブリダイゼーションによって特異的DNAクローンのオートラジオグラフィによる視認が可能になる(Wallace, et al., (1981) *Nucleic Acids Research*, 9: 879)。

[0027] あるいは、そのタンパク質に対する抗体を使用して、少なくとも1つのエピトープを有する本発明のヘプシジタンパク質に対して発現ライブラリーを間接的にスクリーニングすることができる。そのような抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらであってもよく、ヘプシジタンパク質の存在を表示する発現産物を検出するために使用できる。一般に、Agtl1ライブラリーは、Huynh, et al., (1985) (*In DNA Cloning: A Practical Approach*, D. M. Glover, ed., 1: 49)の方法によって免疫学的に構築かつスクリーニングされる。

[0028] ヘプシジタンパク質をコードする特異的DNA配列の発現は、さらにまた、(1)ゲノムDNAからの二本鎖DNA配列の単離と、(2)当該タンパク質にとって必要なコドンを提供するためのDNA配列の化学的製造と、によって入手できる。

these diseases and the screening of the entire population of either humans or animals.

[0008] One aspect of the present invention is a method for diagnosing a disease state characterized by non-physiological levels of hepcidin, the above method, tissue from subjects a step of obtaining a liquid sample, or central portion of the hepcidin samples (50 from amino acid 20) or C terminus (84 amino acids 65) and the step of contacting a fragment thereof or antibodies that bind specifically to a polypeptide from includes a step of quantifying the hepcidin level using an assay based on antibodies and binding polypeptides, and disease status is non-physiological levels of hepcidin. In one embodiment of the invention, diagnostic methods and kits have been established to enable high sensitivity detection in human plasma Purohepushijin. The present invention can be used hepcidin antibody and diagnostic methods and kits for hepcidin as a parameter to measure the progression of the disease during treatment and after treatment mentioned above, opened a wide range of perspectives on the treatment.

[0009] in one embodiment of the present invention relates to the generation and purification of protein fragments and proteins, including hepcidin Purohepushijin. Another embodiment of the invention, hepcidin specific antibodies, fragments or variants thereof relates to, and they in turn can be used in immunoassays to detect the protein hepcidin in human or animal proteins including Purohepushijin question.

[0010] In another aspect of the invention, by hepcidin diagnostic methods and kits, for example, overexpression

[0029] ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術を利用すると、引き続くヘプシジンタンパク質 cDNA のクローニングおよび発現のために、ヘプシジンファミリーの個々のメンバーを増幅させることができる (例えば、米国特許第 4,683,202 号; 第 4,683,195 号; 第 4,889,818 号; Gyllenstein et al., (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 85: 7652-7656; Ochman et al., (1988) *Genetics*, 120: 621-623; Triglia et al., (1988) *Nucl. Acids. Res.*, 16: 8156; Frohman et al., (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 85: 8998-9002; Loh et al., (1989) *Science*, 243: 217-220 を参照)。

[0030] ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列および適切な転写 / 翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築するために、当業者に周知の方法を使用することができる。これらの方法には、インビトロ組換え DNA 技術、合成技術およびインビボ組換え / 遺伝子組換え法が含まれる。例えば、Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., Chapter 12 に記載された技術を参照されたい。

[0031] ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントを発現させるためには、様々な宿主発現ベクター系を利用できる。これらにはヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントに対するコーディング配列を含有する組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA もしくはコスミド DNA 発現ベクターを用いて形質転換された細菌などの微生物; ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントに対するコーディング配列を含有する組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母; ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントに対するコーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター (例、バキュロウイルス) を用いて感染させた昆虫細胞系; またはヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントに対するコーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター (例、アデノウイルス、ワクシニアウイルス) を用いて感染させた動物細胞系が含まれるが、それらに限定されない。

[0032] これらのベクターの発現要素は、それらの強度および特異性が相違する。利用される宿主 / ベクター系に依存して、構成性および誘導性プロモーターを含む多数の適切な転写および翻訳要素のいずれかを発現ベクターにおいて使用できる。例えば、細菌系中でクローニングすると、バクテリオファージ λ , p_{lac}, p_{trp}, p_{tac} (p_{trp}-p_{lac} ハイブリッドプロモーター) などの p_L などの誘導性プロモーターを使用できる。昆虫細胞系中でクローニングすると、バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターなどのプロモーターを使用できる。哺乳動物細胞系中でクローニングすると、アデノウイルス後期プロモーターまたはワクシニアウイルス 7.5 K プロモーターなどのプロモーターを使用できる。組換え DNA または合成技術により産生したプロモーターは、さらにまたヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントに対する挿入されたコーディング配列の転写を提供するために使用できる。

[0033] 酵母では、構成性または誘導性プロモーターを含有する多数のベクターを使用できる。概論については、*Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, (1988) Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience Ch. 13; Grant et al., (1987) *Expression and Secretion Vectors for Yeast*, in *Methods in Enzymology*, Eds. Wu & Grossman, (1987) Acad. Press, N. Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, (1986) *DNA Cloning*, Vol. II, IRL Press, Wash., D. C. Ch. 3; and Bitter, (1987) *Heterologous Gene Expression in Yeast*, *Methods in Enzymology*, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N. Y., Vol. 152, pp. 673-684; および *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, (1982) Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II を参照されたい。酵母中での相補性アッセイのためには、ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントに対する cDNA を、酵母 2 μ 門の存在に起因して酵母中で自発的に複製する酵母エピソードプラスミド (YEP) 内にクローニングすることができる。ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントの配列は ADH もしくは LEU2 などの構成性酵母プロモーターまたは GAL などの誘導性プロモーターのどちらかの後方でクローニングされてよい (*Cloning in Yeast*, Ch. 3, R. Rothstein (1986) In *DNA Cloning* Vol. II, A Practical Approach, Ed. DM Glover, IRL Press, Wash., D. C.)。構築物は、同源ヘプシジンタンパク質 mRNA または酵母遺伝子に対応するヘプシジンタンパク質 mRNA の 5' および 3' 非翻訳領域を含有してい

of hepcidin, such as genetic engineering approach to downregulate or can be used.

[0011] In yet another aspect of the invention, hepcidin, hepcidin, to treat patients by using the agonist or antagonist of hepcidin, and described herein can be used for therapeutic treatment of disease. Iron uptake into cells, by varying the concentration of hepcidin, could be adjusted by inhibiting the binding of hepcidin or TfR2 the iron to the receptor. Accordingly, hepcidin, and hepcidin agonists or antagonists may be useful in treating disorders of the presence of iron metabolism. For example, such substances may be useful in treating diseases such as listed above.

[0012] These and other embodiments of the present invention will be more clearly understood by reference to the following drawings and detailed description.

[0013] in the present invention is to regulate hepcidin iron uptake by mammalian cells, give rise to diseases related to the distribution of iron metabolism and hepcidin expression in unphysiological be described. As used herein, the term "hepcidin" is Purohepushijin, hepcidin, which means a fragment thereof. Physiological concentration of hepcidin in the blood is in the range of about 50 to about 150ng/mL. Non-physiological concentration is lower than this range or above. Fragment or its protein hepcidin protein of the amount of non-physiological, the disorder of iron metabolism cause or excess of iron deficiency such as iron deficiency anemia; secondary hemochromatosis or hemochromatosis and hemosiderosis, ceruloplasmin deficiency, hypotransferrinemia disease,

てよい。Y E p プラスミドは高い効率で形質転換し、これらのプラスミドは極度に安定性である。あるいはまた、酵母染色体内への異種 DNA 配列の統合を促進するベクターが使用されてもよい。

[0034] ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントを発現させるために使用できる特に良好な発現系は昆虫系である。そのような1つの系では、*Autographa californica* 核多核体病ウイルス (AcNPV) が異種遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。ウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞中で増殖する。ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列は、ウイルスの非必須領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) 内にクローニングして AcNPV プロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下に置くことができる。ポリヘドリン遺伝子の挿入の成功は非閉塞性組換えウイルス (すなわち、ポリヘドリン遺伝子によってコードされたタンパク質性被膜が欠如するウイルス) の産生を生じさせる。これらの組換えウイルスは、次いでその中で挿入遺伝子が発現する *Spodoptera frugiperda* 細胞を感染させるために使用される。 (例えば、Smith et al., (1983) J. Biol., 46: 586; Smith, 米国特許第 4, 215, 051 号を参照)。さらに、バキュロウイルス / 昆虫細胞発現系のための材料および方法は、例えば Invitrogen 社 (米国カリフォルニア州サンディエゴ) (Max Bat (商標) キット) からのキット形で市販で入手することができ、そのような方法は参照して本明細書に組み込まれる Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) に記載されているように、当分野において周知である。本明細書で使用するように、本発明のヘプシジンポリヌクレオチドを発現することができる昆虫細胞は形質転換されている。

[0035] アデノウイルスを発現ベクターとして使用した場合は、ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列を後期プロモーターおよび三連リーダー配列などのアデノウイルス転写 / 翻訳制御複合体ヘライゲートすることができる。このキメラ遺伝子は次に、インビボまたはインビトロ組換えによってアデノウイルスゲノム内に挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域 (例、領域 E1 もしくは E3) 内への挿入は、感染した宿主中で生育性であり、そしてヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントを発現することができる組換えウイルスを生じさせるであろう。 (例えば、Logan & Shenk, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 81: 3655-3659 を参照)。あるいは、ワクシニア 7.5 K プロモーターが使用されてもよい。 (例えば、Mackett et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 79: 7415-7419; Mackett et al., (1984) J. Virol., 49: 857-864; Panicali et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 4927-4931 を参照)。

[0036] 挿入されたヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列を効率的に翻訳するためには、特異的開始シグナルが必要になることがある。これらのシグナルには、ATG 開始コドンおよび隣接配列が含まれる。その固有の開始コドンおよび隣接配列を含む全ヘプシジンタンパク質ゲノムが適切な発現ベクター内に挿入されると、追加の翻訳制御シグナルが不要になる可能性がある。しかし、ヘプシジンタンパク質コーディング配列の一部のみが挿入されない場合は、ATG 開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが提供されなければならない。さらに、開始コドンは、全挿入物の翻訳を保证するためにヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列のリーディングフレームと同位相でなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の様々な起源由来であってよい。発現効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを包含することによって強化できる (例えば、Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol., 153: 516-544 を参照)。

[0037] さらに、挿入された配列の発現を調節する、または所望の特定方法で遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。ある種のプロモーターによって駆動される発現は、一定の誘導物質 (例、メタロチオネインプロモーターに対する亜鉛およびカドミウムイオン) の存在によって上昇させることができる。このため、遺伝子組換えにより作製されたヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントの発現は制御できる。これは、クローニング異種遺伝子のタンパク質産物が宿主細胞にとって致死性である場合は重要である。さらに、タンパク質の機能にとってはタンパク質産物の修飾 (例、グリコシル化) およびプロセッシング (例、開裂) が重要なことがある。種々の宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾のために特徴的かつ特異的機構を有する。発現した異種タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを保证するためには、適切な細胞系または宿主系を選択できる。

[0038] ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列を含有し、そして生

iron overload, hereditary and non hereditary, such as atransferrinemia; disease of iron overload caused by uncertainty, disorder of the biliary system, for example, liver disease, alcoholic liver disease, especially non-alcoholic fatty hepatitis type B and hepatitis C infection and chronic; sideroblastic anemia, thalassemia disease, such as use of iron; leukemia, polycythemia, may macrocytic, microcytic anemia may or positive, reticulocytosis Anemia diseases, hematological disorders, such as hemolytic anemia; reticuloendothelial system failure due to infection and disease; inflammatory and infectious diseases including sepsis; cancer, sarcoma, non-physiological levels of hepcidin, such as lymphoma induce immunologic diseases and tumors; associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Wilson disease. This discovery, development of assays for hepcidin protein and protein fragments, made possible the purification of biological activity while preserving their natural configuration and follow it. The invention, in part, in patients suffering from certain disorders of human or animal tissue, are based on the discovery that the presence of protein-protein hepcidin in the blood and body fluids.

[0014] The present invention, human or animal tissue, including the Purohepushijin quality protein hepcidin in patients with these disorders, in blood and body fluids in patients with these disorders are not normal human or animal tissue, providing the first proof that greatly exceed the levels present in concentrations found in blood and body fluids. This tissue from the patient, the steps of inspecting a sample of blood or body fluid, a step of detecting the presence and amount Purohepushijin and / or protein-protein

物学的に活性なヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントの遺伝子産物を発現する宿主細胞は、少なくとも4種の一般的アプローチによって同定できる。(a) DNA-DNAハイブリダイゼーション; (b) 「マーカー」遺伝子機能の存在もしくは不在; (c) 宿主細胞中のヘプシジタンパク質 mRNA 転写体の発現によって測定される転写レベルの評価; および (d) イムノアッセイまたはその生物活性によって測定されるヘプシジタンパク質遺伝子産物の検出。

[0039] 第1アプローチでは、発現ベクター内に挿入されたヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列の存在は、実質的に近年に記載されたように (Pigeon et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819) ヘプシジタンパク質のコーディング配列もしくはその特定部分と相同であるヌクレオチド配列を含むプローブを使用して DNA-DNA ハイブリダイゼーションによって検出できる。

[0040] 第2アプローチでは、組換え発現ベクター/宿主系は一定の「マーカー」遺伝子機能(例、チミジンキナーゼ活性、抗体に対する抵抗性、メトトレキサートに対する抵抗性、形質転換表現型、バキュロウイルス中での閉塞体形成など)の存在もしくは不在に基づいて同定および選択することができる。例えば、ヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列をベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入すると、マーカー遺伝子機能の不在によってヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列を含有する組換え体を同定できる。あるいは、使用される同一もしくは相違するプロモーターの制御下でヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列と平行に配置すると、マーカー遺伝子は、ヘプシジンコーディング配列の発現を制御することができる。誘導または選択に反応したマーカーの発現は、ヘプシジタンパク質コーディング配列の発現を示唆している。

[0041] 第3アプローチでは、ヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング領域についての転写活性をハイブリダイゼーションアッセイによって評価できる。例えば、RNAは実質的に (Pigeon et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819) に記載されているようにヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントのコーディング配列またはそれらの特定部分と相同であるプローブを使用するノーザンブロットによって単離および分析することができる。あるいは、そのようなプローブに対するハイブリダイゼーションのために宿主細胞の全核酸を抽出およびアッセイすることができる。

[0042] 第4アプローチでは、ヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントの産物の発現は、例えばウェスタンブロット法、放射性免疫沈降法、酵素結合イムノアッセイなどのイムノアッセイによるように免疫学的に評価できる。

[0043] ヘプシジタンパク質もしくはそのフラグメントを発現する組換え体が同定されると、遺伝子産物が分析されなければならない。これはその産物の物理的、免疫学的または機能的特性に基づくアッセイによって達成できる。例えば、本発明の方法には、本発明のヘプシジンポリヌクレオチドを含有する適切な発現ベクターを含有する宿主細胞がコードされたヘプシジタンパク質の発現を可能にする条件下で培養される、ヘプシジタンパク質を産生するための工程が含まれる。ヘプシジタンパク質は、培養から、便宜的には培地から、または宿主細胞から調製された溶解液から回収し、さらに精製することができる。好ましい実施形態には、そのような工程によって産生したタンパク質がそのタンパク質の全長形または成熟形である実施形態が含まれる。

[0044] 本発明は、本発明の核酸フラグメントまたは本発明の核酸フラグメント変性変異体によってコードされた単離ヘプシジタンパク質をさらに提供する。「変性変異体」とは、本発明の核酸フラグメント(例、ORF)とは核酸配列が相違するが、しかし遺伝コードの縮重のために同一タンパク質配列をコードするヌクレオチドフラグメントを意図する。本発明の好ましい核酸フラグメントは、タンパク質をコードするORFである。

[0045] 本発明のヘプシジタンパク質は、あるいはまたヘプシジタンパク質を発現するように変化させられた細胞から精製することができる。本明細書で使用するように、細胞は、その細胞が遺伝子操作を通してそれが通常は産生しない、またはその細胞が通常は低レベルで産生するヘプシジタンパク質を産生するようにさせられた場合に所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するように変化させられる。当業者であれば、本発明のヘプシジタンパク質を産生する細胞を精製するために組換えまたは合成配列のどちらかを真核細胞または原核細胞内へ導入および発現させるための方法を容易に採用することができる。

[0046] 本発明のヘプシジタンパク質は、さらにまたトランスジェニック動物の産物として、例えばヘプシジタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する体細胞または胚細胞を特徴とするトランスジェニックウシ、ヤギ、ブタ、またはヒツジの乳汁の構成成分として発現させることもできる。

hepcidin is accomplished by. According to the invention, tissue, detection and quantitative measurements of any protein containing a hepcidin protein or fragments thereof in body fluids or blood Purohepushijin, confirmed the clinical diagnosis of the diseases described herein in affected patients, the disease also useful in tracking the progress. The present invention is to stabilize such diseases, to reduce the incidence of such diseases, monitoring the disease during the period and the subsequent duration of treatment with the drug being tested for the ability of preventing or is also useful.

[0015] only for the purpose of illustrating the invention, (a) generating a hepcidin protein or protein fragment containing the Purohepushijin, (b) contains a fragment thereof Cheb Purohepushijin step of generating antibodies that specifically bind to the protein a poet, (c) to diagnose disease subtypes described herein, assays and kits for diagnosing or monitoring, (d) or overexpressing hepcidin Purohepushijin to be, and how to down-regulate, and (e) for the treatment of disorders described herein.

[0016] In one embodiment of the invention, Applicants' invention provides a method for determining the role of hepcidin in physiological conditions and related diseases. In another aspect of the invention, Applicants' invention provides an antibody specific for the C-terminal and central part of the hepcidin precursor molecule. In this aspect of the invention, the explicit localization of hepcidin in the liver cells in humans and guinea pigs using these antibodies. HH, chronic renal insufficiency (CRI) and renal anemia (RA) has established a highly sensitive ELISA to detect Purohepushijin in patients with human serum. Applicants' invention is will

[0047] ヘプシジンタンパク質は、知られている従来型化学合成によって産生させることもできる。合成手段によって本発明のヘプシジンタンパク質を構築する方法は当業者には知られている。合成法により構築したヘプシジンタンパク質配列は、天然ヘプシジンタンパク質と一次、二次または三次構造および/または立体配座特徴を共有することによって、タンパク質活性を含むそれらと共通する生物学的特性を有する可能性がある。そこで、それらは治療用化合物のスクリーニングおよび抗体を発生させるための免疫学的工程において天然の精製ヘプシジンタンパク質に対する生物学的に活性な、または免疫学的代用物として使用できる。

[0048] 本発明のヘプシジンタンパク質は、組換えタンパク質を発現させるために適切な培養条件下で形質転換宿主細胞を培養することによって調製することができる。結果として生じる発現したヘプシジンタンパク質は次に、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーなどの知られている精製工程を使用して、そのような培養から（すなわち、培地または細胞抽出液から）精製することができる。ヘプシジンタンパク質の精製は、そのタンパク質に結合する物質を含有しているアフィニティークラム、コンカナバリン A-アガロース、heparin-toyopearl（商標）もしくは Cibacrom blue 3GA Sepharose（商標）などの親和性樹脂にわたる 1 つ以上のカラムステップ、フェニルエーテル、プチルエーテル、もしくはプロピルエーテルなどの樹脂を使用する疎水性相互作用クロマトグラフィーを含む 1 つ以上のステップ、またはイムノアフィニティークロマトグラフィーをさらに含むことができる。

[0049] あるいは、本発明のヘプシジンタンパク質はさらにまた精製を容易にする形態で発現させることができる。例えば、それはマルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）またはチオレドキシン（TRX）の融合タンパク質などの融合タンパク質として、または His タグとして発現させることができる。そのような融合タンパク質の発現および精製のためのキットは、New England BioLab 社（マサチューセッツ州ベバリー）、Pharmacia 社（ニュージャージー州ピスカタウェイ）および Invitrogen 社各々から市販で入手できる。ヘプシジンタンパク質はさらにまた 1 つのエピトープを用いてタグ付けし、引き続いてそのようなエピトープに向けられた特異的抗体を使用することによって精製できる。そのようなエピトープの 1 つ（「FLAG（登録商標）」）は Kodak 社（コネチカット州ニューヘブン）から市販で入手できる。

[0050] タンパク質活性の全体または一部（例、TfR2 受容体への結合、ヘプシジン特異的抗体への結合など）を維持すると予想され、スクリーニングまたは他の免疫学的方法のために有用であるヘプシジンタンパク質 / ペプチドの配列のその他のフラグメントおよび誘導体もまた本明細書の開示を前提にすると当業者であれば容易に作製することができる。そのような修飾は本発明によって包含されている。

[0051] ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントは、それが遺伝子配列の一部分である全遺伝子配列の発現から生じたのか、またはキメラタンパク質の産生を指示するためにライゲートされる 2 つ以上の遺伝子配列の結果として生じたのかにはかわらず免疫反応性のはずである。この反応性は、放射性免疫沈降法、放射性免疫競合法、またはイムノブロットなどの免疫学の標準技術によって明示できる。

[0052] ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントを定義する抗体の生成 当分野において知られている様々な方法を使用すると、ヘプシジンタンパク質の中央部分（アミノ酸 20 から 50）またはエピトープの C 末端（アミノ酸 65 から 84）に対する抗体を産生することができる。ヘプシジン特異的抗体はそれらのエピトープに結合するが、他の知られている配列には結合しない。そのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fab フラグメントおよび Fab 発現ライブラリーが含まれるが、それらに限定されない。抗体を産生させるためには、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがそれらに限定されない様々な宿主動物を特定ヘプシジンタンパク質もしくは合成ヘプシジンタンパク質を用いた注射によって免疫にすることができる。免疫学的反応を増加させるためには、宿主の種に依存して、フロイントの（完全および不完全）アジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性剤、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、アオガイヘモグアニン、ジントロフェノール、ならびに BCG（bacille Calmette-Guérin）および corynebacterium parvum などの潜在的に有用なヒトアジュバントを含むがそれらに限定されない様々なアジュバントを使用できる。

[0053] ポリクローナル抗体は、例えばウマ、ウシ、様々な鳥類、ウサギ、マウス、またはラットなどの種々の温血動物から当業者が容易に生成することができる。手短には、ヘプシジンは、フロイントの完全もしくは不完全アジュバントなどのアジュバントの腹腔内、筋肉内、眼内、または皮下注射を通して動物を免疫にするために利用される。数回のブースター免疫後に、血清サンプルが収集され、ヘプシジンに対する反応性について試験される。特に好ましいポリクローナル抗血清は、これらのアッセイの 1 つでバックグラウンドより少なくとも 3 倍以上高いシグナルを生じさせるであろう。動物の力価がヘプシジンに対する反応性に関して

be released into the blood across the basolateral membrane Purohepushijin hepatocytes have been shown to undergo renal excretion. Because serum levels of hepcidin is down-regulated significantly in RA and chronic HH, hepcidin should play a role in the pathophysiology of these diseases.

[0017] for isolation of the protein of the present invention hepcidin protein from the blood and body fluids hepcidin production of quality protein, the term "protein hepcidin protein" is, Pigeon and co-workers ((2001) J.Biol.Chem.276,7811-7819) is defined as the mammalian hepcidin polypeptide sharing about 80 percent amino acid sequence identity and predicted amino acid sequence was published by. The protein hepcidin protein provided herein is Purohepushijin include hepcidin and its fragments. The protein hepcidin proteins provided herein is provided naturally its modification similar to a protein hepcidin purified protein further contains a protein, wherein the amino acid sequence are produced recombinantly or intentionally. For example, the skilled artisan, can be modified hepcidin peptide or DNA sequences using known techniques. Such modifications in the sequence of the protein hepcidin protein, amino acid residue change in the chosen coding sequence, substitution, replacement may contain insertions or deletions. For example, a deletion may have one or more cysteine ??residues to alter the conformation of the molecule may be replaced with other amino acids or. Such changes, substitutions, replacements, insertions or deletions of technology is well known to those skilled (see, eg, U.S. Pat No. 4,518,584). Preferably, such a change, substitution, replacement, insertion or deletion retains the desired

プラトーに到達すると、週1回の出血、または動物を放血させることのどちらかによってより大量の抗血清を容易に入手できる。

[0054] ヘプシジンのペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養中の連続的細胞系による抗体分子の産生を提供するいずれかの技術を使用することによって調製できる。これらには、Kohler and Milstein, (Nature, (1975) 256: 495-497) によって最初に記載されたハイブリドーマ技術、より近年のヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosbor et al., (1983) Immunology Today, 4: 72) およびEBV-ハイブリドーマ技術 (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) が含まれるが、それらに限定されない。本発明の追加の実施形態では、ヘプシジンタンパク質/ペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、近年の工学技術を利用して無菌動物中に生成することができる (PCT/US90/02545)。本発明によると、ヒト抗体を使用でき、そしてヒトハイブリドーマを使用することによって (Cote et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 2026-2030) またはインビトロでEBVウイルスを用いてヒトB細胞を形質転換させることによって (Cole et al., (1985) in, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 入手できる。実際に、本発明により、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術 (Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855; Neuberger et al., (1984) Nature, 312: 604-608; Takeda et al., (1985) Nature, 314: 452-454) は、適切な生物活性を備えるヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒に、適切な抗原特異性を備えるマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによって使用できる。そのような抗体は本発明の結果である。

[0055] 本発明によると、ヘプシジンタンパク質特異的一本鎖抗体を産生するために一本鎖抗体を産生するために記載された技術 (米国特許第4, 946, 778号) を適合させることができる。

[0056] 本発明の追加の実施形態は、ヘプシジンタンパク質/ペプチドに対する所望の特異性を備えるモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ容易な同定を可能にするFab発現ライブラリーを構築するために記載された技術 (Huse et al., (1989) Science, 246: 1275-1281) を利用する。

[0057] ヘプシジンタンパク質に対する特異的結合部位を含有する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成できる。例えば、そのようなフラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって生成できるF(ab')₂フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を減少させることによって生成できるFabフラグメントが含まれるが、それらに限定されない。

[0058] 診断アッセイおよびキット 本発明のさらにまた別の目的は、ヘモクロマトーシス、鉄欠乏性貧血、ヘモジリン沈着症、肝硬変および本明細書に記載のその他の疾患に罹患している個体からヘプシジンタンパク質を検出するための診断アッセイに使用するための試薬を提供することである。

[0059] この実施形態の1つの様式では本発明のヘプシジンタンパク質はヘモクロマトーシス、鉄欠乏性貧血、ヘモジリン沈着症、肝硬変および本明細書に記載のその他の疾患に罹患しているそれらの個体を検出するためのイムノアッセイにおける抗原として使用できる。本発明のヘプシジンタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドは、ほんの少数を挙げると、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ、「サンドイッチ」アッセイ、沈降反応、ゲル拡散免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Aイムノアッセイおよび免疫電気泳動法アッセイを含むがそれらに限定されない当分野において知られているいずれかのイムノアッセイシステムで使用できる。米国特許第4, 629, 783号およびその中で言及された特許もまた適切なアッセイについて記載している。

[0060] 本発明によると、様々な形態のヘプシジンタンパク質に対して産生したモノクローナルまたはポリクローナル抗体は、ヘモクロマトーシス、鉄欠乏性貧血、ヘモジリン沈着症、肝硬変および本明細書に記載のその他の疾患に罹患している患者を診断するために血液、脊髄液またはその他の体液のサンプルに対するイムノアッセイにおいて使用できる。

[0061] 本発明の1つの実施形態では、血液サンプルは静脈切開によって患者から採取され、EDTAなどの抗凝固剤と接触せられ、混合され、600gで10分間遠心され、血漿が当分野において一般的であるように採取される、または脊髄液サンプルは腰椎穿刺

activity of that protein. The region is important for protein-protein hepcidin protein function, and alanine amino acid substitution and systematic single-stranded or double stranded, can be tested for biological activity by alanine the resulting alanine-containing variant and subsequent including scanning method can be determined by various methods known in the art. This type of analysis determines the importance of one or more amino acid substitutions in biological activity.

[0018] hepcidin production of quality protein, using standard techniques known in the art, hemochromatosis, iron deficiency anemia, hemosiderosis, liver cirrhosis and human or animal tissues that are suffering from other diseases described herein, steps can be accomplished by isolating the protein hepcidin protein from the blood or body fluids. Such techniques are included in the present invention, the step of growing the culture of host cells in an appropriate medium further includes the step of purifying the protein hepcidin protein from cultured cells grow in the cells or a method for producing a protein-protein hepcidin.

[0019] By using various methods known in the art, one can obtain the quality of the isolated hepcidin proteins present invention. For example, the protein hepcidin protein, furthermore, as predicted by sequencing and cloning the cDNA encoding a protein hepcidin protein, chemical synthesis of the amino acid sequence of protein hepcidin protein (Pigeon et al., (2001) J. Biol.Chem.276,7811-7819) can also be produced by. By using this protein hepcidin protein sequence information, it is possible to predict the appropriate amino acid sequence of protein fragments that are chemically synthesized hepcidin protein using

によって患者から採取される。

[0062] 本明細書に記載の抗体は、組織、血液もしくは体液のサンプル中のヘプシジンタンパク質の存在を決定するために多数の様々なイムノアッセイにおける基本的試薬として使用できる。一般的に述べると、抗体は定性的であっても定量的であろうと、あらゆるタイプのイムノアッセイにおいて使用できる。これには非競合タイプの 2 サイト・サンドイッチアッセイおよび 1 サイト・イムノアッセイの両方、ならびに伝統的競合結合アッセイが含まれている。

[0063] 検出の容易さ、およびその定量的性質のために特に好ましいのは、多数の変形が存在するサンドイッチアッセイまたは二重抗体アッセイであり、その全てが本発明に包含されることが意図されている。

[0064] 例えば、典型的なフォワードサンドイッチアッセイでは、非標識抗体が例えばマイクロタイタープレートウエルのような固体基質上に固定され、そして検査対象のサンプルが結合した分子と接触せられる。抗体-抗原二元複合体の形成を許容するために十分な期間である適切なインキュベーション時間後、次に検出可能なシグナルを誘導できるレポーター分子で標識された二次抗体が添加され、相違する部位での抗原との結合および抗体-抗原-標識抗体の三元複合体の形成を可能にする十分な時間にわたりインキュベーションが継続される。未反応物質は洗い流され、既知量の抗原を含有するコントロールサンプルとの比較によって定量できるシグナルの観察によって抗原の存在が決定される。フォワードサンドイッチアッセイの変形には、サンプルおよび抗体の両方が結合抗体へ同時に添加される同時アッセイ、または標識抗体および検査対象のサンプルが最初に結合され、インキュベートされ、そして非標識表面結合抗体へ添加される逆サンドイッチアッセイが含まれる。これらの技術は当業者には周知であり、小さな変形の可能性は容易に明白であろう。本明細書で使用する用語「サンドイッチアッセイ」は、基本的 2 サイト法の全ての変形を包含することが意図されている。

[0065] 本発明のサンドイッチアッセイについては、唯一の限定因子は両方の抗体がヘプシジンタンパク質に対して相違する結合特異性を有することにある。そこで、多数の組み合わせが考えられる。

[0066] より特別な実施例として、典型的なフォワードサンドイッチアッセイでは、一次抗体は固体支持体へ共有結合的、または受動的のどちらかで結合せられる。固体表面は通常はガラスまたはポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンである。固体支持体は、チューブ、ビーズ、ディスクもしくはマイクロプレート、またはイムノアッセイを実施するために適切な任意のその他の表面であってよい。結合工程は、当分野において周知である。結合に続いて、固相-抗体複合体は検査サンプルの調製において洗浄される。検査対象のヘプシジンタンパク質を含有する体液のアリコートを次に固相複合体に添加され、ヘプシジンタンパク質に対して特異的な抗体へ提示されたいずれかのヘプシジンタンパク質の結合を可能にするために十分な時間にわたり 25℃ でインキュベートされる。次に二次抗体が固相複合体へ添加され、一次抗体-抗原固相複合体への結合を可能にする十分な追加の時間にわたり 25℃ でインキュベートされる。二次抗体はレポーター分子へ結合させられ、レポーター分子の可視シグナルを使用してサンプル中の抗原への二次抗体の結合が表示される。本明細書で使用する用語「レポーター分子」は、その化学的性質によって、抗原結合抗体の検出を許容する分析的に検出可能なシグナルを提供する分子を意味する。検出は、サンプル中の抗原の量の決定を可能にするために少なくとも相当に定量可能でなければならないが、これは絶対的な意味で計算できる、または知られている正常レベルの抗原を含有する標準物質（または一連の標準物質）との比較で行うことができる。

[0067] このタイプのアッセイで最も一般的に使用されるレポーター分子は、酵素または蛍光体のどちらかである。酵素イムノアッセイの場合には、酵素は、しばしばグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩によって、二次抗体へコンジュゲートせられる。しかし容易に認識されるように、極めて広範囲の様々なコンジュゲーション技術が存在しており、当業者には周知である。一般に使用される酵素には、特にホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼが含まれる。特定酵素と一緒に使用される基質は、対応する酵素による加水分解後に一般に検出可能な変色を産生させるために選択される。例えば、アルカリホスファターゼコンジュゲートと一緒に使用するためには p-ニトロフェニルホスフェートが適切である。ペルオキシダーゼコンジュゲートのためには、1, 2-フェニレンジアミンまたはトルイジンが通例使用される。さらにまた、上記の色素原基質以外の蛍光産物を産生する蛍光原基質を使用することもまた可能である。全ての場合に、酵素標識抗体が第 1 抗体-ヘプシジンタンパク質複合体に添加され、その複合体に結合させられ、そして次に過剰な試薬が洗い流される。次に適切な基質を含有する溶液が抗体-抗原-標識抗体の三元複合体へ添加される。基質は二次抗体に結合した酵素と反応し、定性的可視シグナルを生じさせ、これはさらに通常は分光光度法によって定量すると血清サンプル中に存在する抗原の量の評価を可能にする。

standard peptide synthesis methods known in the art. These methods, R. Bruce Merrifield, (Erickson and Merrifield, "Solid-Phase Peptide Synthesis", In The Proteins, Volume 2, H. Neurath and R. Hill (Eds.) Academic Press, Inc., New York pp.255-257; Merrifield, (1986) "Solid phase synthesis", Science, 242:341-347) containing the solid phase was developed by. Solid phase is gradually added to the growth of peptide chains bound to an insoluble matrix of amino acids such as polystyrene beads. The major advantage of this method is the point which is bound to the beads can be rapidly filtered and washed with the desired product at each stage, a point which avoids the need to purify intermediates for this purpose. Because these reactions are all carried out in a single container, eliminating losses due to repeated transport of the product. Solid phase peptide synthesis of this chemical can be easily automated, which can be synthesized routinely performed in good yield and purity of the peptide containing 50 residues (Stewart and Young, (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chemical Co.; Tam et al., (1983) J. Am. Chem. Soc., 105:6442). For example, amino acid residues 50-1 shown in Figure 9, could synthesize a protein fragment corresponding to the hepcidin protein or 84-34. In the simplest level, in order to produce small peptides and fragments of the protein hepcidin protein, peptide synthesis is particularly useful commercially available equipment. Fragments are useful for generating antibodies against proteins such as natural protein hepcidin.

[0020] A skilled artisan can readily obtain one of the proteins isolated hepcidin protein of the invention according to known methods

[0068]あるいは、フルオレセインまたはローダミンなどの蛍光化合物は、それらの結合能力を変化させずに抗体へ化学結合することもできる。特定波長の光線を用いて照明して活性化させると、蛍光色素標識抗体は光線エネルギーを吸収し、特徴的な長い波長での光線の放射に続いて分子に励起性の状態を誘導する。発光は、光線顕微鏡を用いて可視的に検出できる特徴的な色として現れる。酵素イムノアッセイ (EIA) におけるように、蛍光標識抗体は一次抗体-ヘプシジタンパク質複合体へ結合させられる。未結合試薬を洗浄した後、残っている三次複合体は次に適切な波長の光線に暴露させられ、そして観察された蛍光は抗原の存在を指示する。免疫蛍光法および EIA 法はどちらも当分野において極めて良好に確立されており、本発明の方法のためには特に好ましい。しかし、放射性同位体、化学発光または生物発光分子などの他のレポーター分子もまた使用できる。当業者には、必要に応じて適応させるために手順を変化させる方法は容易に明白であろう。

[0069]あるいは、ヘプシジタンパク質を含有するヒトの血液または脊髄液のいずれかである検査対象のサンプルは 1 サイトイムノアッセイに使用できるが、サンプルは固体基質へ共有的または非共有的のどちらかで付着させられる。非標識抗ヘプシジタンパク質抗体は固体基質上に結合したサンプルと接触させられる。抗体-抗原二元複合体の形成を許容するために十分な期間である適切なインキュベーション時間後、次に検出可能なシグナルを誘導することのできるレポーター分子で標識された二次抗体が添加され、抗原-抗体-標識抗体の三元複合体の形成を可能にする十分な時間にわたりインキュベーションが継続される。1 サイトイムノアッセイのためには、二次抗体は、当該のヘプシジタンパク質に対して特異的である抗体と結合できる一般的な抗体 (すなわち、免疫グロブリンに対する異種抗体、特にレポーター分子に結合した抗-IgM および IgG 抗体) であってよい。

[0070]ヘプシジン遺伝子 (突然変異または正常) は鉄代謝のアッセイに利用できる。この遺伝子は、いずれかの付随分子と共に、もしくは伴わずに、ヒトもしくは動物被験者、健康被験者由来の細胞系もしくは一次細胞中、または他の有機体 (齧歯類、昆虫、細菌、両生類など) 由来の細胞中で発現する。これらの細胞による鉄の取り込みは、例えば放射性同位体を使用して測定される。さらに、ヘプシジン遺伝子産物への鉄の結合もまた測定できる。そのような実験は、鉄の取り込み、結合、ならびに細胞による、もしくは細胞中の輸送におけるヘプシジン遺伝子およびヘプシジン遺伝子産物の役割を評価するのに役立つ。

[0071]治療的処置 本発明の 1 つの態様では、ヘプシジンによる診断方法およびキットは、例えばヘプシジンを過剰発現する、またはダウンレギュレートするための遺伝子工学的アプローチに使用できる。一定の治療用途では、ヘプシジン遺伝子、突然変異ヘプシジン遺伝子、ヘプシジタンパク質、または突然変異ヘプシジタンパク質の発現および / または機能をダウンレギュレートするのが望ましい。例えば、鉄が例えばある種の貧血 (すなわち、サラセミア、溶血性貧血、輸血) で、身体内の蓄積量が少ない状態では、正常ヘプシジン遺伝子もしくは正常ヘプシジタンパク質のダウンレギュレーションが望ましい。他方、鉄が身体内に過剰に蓄積されている状態では、突然変異ヘプシジン遺伝子またはヘプシジタンパク質のダウンレギュレーションが望ましい。

[0072]上記のように、正常または突然変異ヘプシジタンパク質に特異的な抗体を調製できる。そのような抗体は、本明細書に記載の疾患において治療的に使用できる。例えば、突然変異タンパク質に関連する機能が正常ヘプシジタンパク質機能をアップレギュレートして身体内の鉄の過剰蓄積をもたらし場合に、突然変異または正常ヘプシジン遺伝子の作用を遮断するために使用できる。同様に、抗体は身体内の鉄の過剰蓄積を引き起こすヘプシジタンパク質の作用を遮断するために治療的に使用できる。

[0073]同様の方法で、正常または突然変異形のいずれかであるヘプシジン遺伝子は、その遺伝子またはその転写体に対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を通してダウンレギュレートすることができる。上記で考察したように抗体と結び付けて類似の戦略を利用できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計に関する考察および使用についての特に貴重な概論については、その開示がこれにより参照して組み込まれる Uhlmann et al., (1990) Chemical Reviews 90: 543-584 を参照されたい。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、いずれかの知られている化学的オリゴヌクレオチド合成方法によって合成できる。そのような方法は、一般に、例えば Winnacker Chirurg (1992) 63: 145 に記載されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、最も有益には市販で入手できるいずれかの自動核酸合成装置を利用して調製される。そのような装置の 1 つである Applied Biosystems 社製 380 B 型 DNA 合成装置は、 β -シアノエチルホスホロアミダイトの化学的性質を利用する。

[0074]ヘプシジン遺伝子に相補的である DNA の完全ヌクレオチド合成は知られているので、cDNA 配列の mRNA 転写体もまた知られている。したがって、そのような転写体のいずれかの部分とハイブリダイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当業者に知られているオリゴヌクレオチド合成方法によって調製できる。本発明の実践ではいずれかの長さ

for isolating proteins. These methods, immunochromatography, HPLC, size exclusion chromatography, ion exchange chromatography, and immunoaffinity chromatography and contain, but not limited to them. For example, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag (1994); Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ausubel et al., See Current Protocols in Molecular Biology.

[0021] Finally, to further purify the protein hepcidin protein, RP, such as hydrophobic silica having a pendant group or other aliphatic groups such as methyl-HPLC using a medium reverse phase high performance liquid chromatography to more than one (RP-HPLC) steps can be used. To provide quality recombinant protein hepcidin substantially homogeneous isolated, can be used in various combinations of some or all of the above purification steps. The protein was purified hepcidin protein thus does not contain any other mammalian protein substantially, which is defined as the protein isolated by the present invention.

[0022] an array of protein hepcidin protein can be identified using Edman degradation protein sequencing technique. This way, the continuous removal of one amino acid residue from the amino terminus of the peptide once the law for a subsequent sequence identification by chromatographic methods. For example, Konigsberg and Steinman, (1977) Strategy and Methods of Sequence Analysis, in Neurath and Hill (eds.), The Proteins (3rd ed.) Vol. 3, pp. 1-178, see the technology described in the Academic Press. In addition, protein sequence analysis of protein hepcidin, (Hewick et al.,

のオリゴヌクレオチドを利用できるが、12塩基より短い配列は標的mRNAへハイブリダイズする際に特異性が小さく、酵素消化によってより容易に破壊され、そして酵素消化によって不安定化される可能性がある。したがって、12ヌクレオチド以上を有するオリゴヌクレオチドが好ましい。長い配列、特に約40ヌクレオチドを超える配列は、標的細胞による取り込みが低下するために、翻訳を阻害することに有効性がいくらか低い可能性がある。そこで、好ましいのは12~40ヌクレオチド、より好ましいのは15~30ヌクレオチド、最も好ましいのは18~26ヌクレオチドのオリゴマーである。特に最も好ましいのは18~24ヌクレオチドの配列である。

[0075] 本発明のさらにまた別の態様では、ヘプシジンは、ヘプシジン、ならびにヘプシジンのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて患者を治療することによって、本明細書に記載の疾患の治療に使用できる。細胞中の鉄取り込みは、ヘプシジンの濃度を变化させることによって、および/または鉄またはトランスフェリン受容体へのヘプシジン結合を阻害することによって調節できる。したがって、ヘプシジン、およびヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストは鉄代謝の障害が存在する状態の治療において有用な可能性がある。例えば、そのような物質はヘモクロマトーシス、神経変性疾患、虚血性脳卒中もしくは外傷を含む虚血性組織損傷、心疾患、および腫瘍、特に皮膚癌、ならびに本明細書に記載のその他の疾患などの状態の治療において有用なことがある。

[0076] 本発明は、さらにまたヘプシジンを使用する鉄代謝を変調する方法を包含している。特に、本発明は鉄代謝における障害を含有する状態を治療するための方法であって、鉄代謝のヘプシジン、またはヘプシジンの刺激剤、アゴニストもしくはアンタゴニストを投与するステップを含む方法に関する。本発明の方法を使用して治療できる鉄代謝の障害を含む状態には、例えば、ヘモクロマトーシス、神経変性疾患、虚血性脳卒中もしくは外傷を含む虚血性組織損傷、心疾患、および腫瘍、特に皮膚癌ならびに本明細書に記載のその他の疾患が含まれる。ヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストである物質は、その物質がヘプシジンと鉄との、またはヘプシジンとトランスフェリン受容体TfR1もしくはTfR2との結合活性に及ぼす作用、またはその物質がヘプシジンを発現できる細胞中のヘプシジンの発現に及ぼす作用を決定することによって同定でき、この細胞は、それらの表面上でヘプシジンを発現するように遺伝子組換えにより作製された細胞を含む。

[0077] このため本発明は、1つの態様で、ヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストを同定する方法に関しており、これは、ヘプシジンが鉄に結合できる条件下でヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストであることが疑われる物質とヘプシジンおよび鉄とを反応させるステップと、鉄に結合したヘプシジンの量を測定するステップと、鉄と結合したヘプシジンの量をコントロールについて決定した量と比較することによってその物質の作用を決定するステップとを含む。本発明は、さらにまたヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストを同定する方法に関しており、この方法は、ヘプシジンがトランスフェリン受容体に結合できる条件下でヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストであることが疑われる物質とヘプシジンおよびトランスフェリン受容体とを反応させるステップと、トランスフェリン受容体に結合したヘプシジンの量を測定するステップと、トランスフェリン受容体と結合したヘプシジンの量をコントロールについて決定した量と比較することによってその物質の作用を決定するステップとを含む。

[0078] 本発明はさらにまた、ヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストを同定する方法に関しており、この方法は、ヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストであることが疑われる物質とヘプシジンとを産生する細胞とを反応させるステップと、細胞によって発現したヘプシジンの量を測定するステップと、ヘプシジンの発現量をコントロールについて決定した量と比較することによってその物質の作用を決定するステップとを含む。本発明はさらにまた、ヘプシジン媒介性鉄取り込みのアゴニストもしくはアンタゴニストを同定する方法に関しており、この方法は、鉄の存在下およびトランスフェリンの不在下においてその表面上でヘプシジンを発現する細胞とヘプシジンのアゴニストもしくはアンタゴニストであることが疑われる物質とをインキュベートするステップと、細胞内への鉄取り込み量を測定するステップと、および細胞内の鉄取り込み量とその物質の不在下でのコントロールインキュベーションからの細胞内の鉄取り込み量とを比較することによってヘプシジン媒介性鉄取り込みのアゴニストもしくはアンタゴニストを同定するステップとを含む。

[0079] 本発明の一部の実施形態では、ヘモクロマトーシスなどの一次鉄過剰疾患もしくは症候群、または例えば繰り返しの輸血のような二次的原因により引き起こされた他の鉄過剰状態の症状を有する患者において治療使用するためのヘプシジンペプチドが提供される。ヘプシジンペプチドは、全長ヘプシジンまたはヘプシジンの一部のフラグメントであってよい。好ましくは、ヘプシジンペプチドはヘプシジンの28から47または70から80のアミノ酸残基を含む。ヘプシジンの予測されるアミノ酸配列ならびにゲノムおよびcDNA配列は、これによりそれらの全体が参照して組み込まれる(Krause et al., (2000) F EBS Lett. 480, 147-150; Pigeon et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819)に提供された。ヘプシジンタンパク質もしくはそのフラグメントは、例えば複合体の形状にあるβ-2-ミクログロブリンと

(1981) J. Biol. Chem. 256:7990-7997; Stein and Undefried, (1984) Anal. Chem., 136:7-23) to can be accelerated by using automated liquid phase amino acid sequenator according to the techniques described will enable the analysis of picomolar amounts of protein-protein hepcidin by it.

[0023] protein hepcidin purified protein, in order to identify molecules that bind to the protein hepcidin protein can be used for in vitro binding assays known in the art. These molecules, eg small molecules, molecules from combinatorial libraries that contain the antibody or other protein, but not limited to them. Molecules identified in binding assays are tested for agonist or antagonist activity in vivo tissue culture or animal model known in the art then. Briefly, the molecules are titrated in cell cultures or more animals are tested for either death or long-term animal survival / cell death / next animal.

[0024] In addition, toxin-binding molecule such as ricin or cholera bacteria, for example, if you have a complex with other compounds or toxic to cells. The toxin-binding molecule complex is then targeted to the tumor or other cell binding molecule to the specificity of protein-protein hepcidin.

[0025] In other embodiments, hepcidin protein cloning and expression of recombinant proteins, protein hepcidin production quality can be achieved by recombinant DNA engineering techniques. For example, the appropriate nucleotide coding sequence of hepcidin is prepared in a suitable host cell and cloning, and can be expressed. DNA sequence encoding a protein hepcidin protein is known so (Pigeon et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-

一緒に投与されてよい。一部の実施形態では、約 20 アミノ酸より大きいヘプシジンタンパク質は β -2-ミクログロブリンとの複合体で投与される。

[0080] 本発明の一部の実施形態では、ヘプシジンタンパク質もしくはトランスフェリン受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストが提供される。ヘプシジンポリペプチドのアゴニスト、および/またはトランスフェリン受容体のアンタゴニストは例えば原発性もしくは続発性鉄過剰疾患もしくは症候群の治療において有用であるが、他方ヘプシジンポリペプチドのアンタゴニスト、またはトランスフェリン受容体のアゴニストは例えば貧血症などの鉄欠乏性状態の治療において有用である。他の実施形態では、野生型ヘプシジンタンパク質のアンタゴニストとして機能する突然変異ヘプシジンタンパク質/ペプチドが提供される。アンタゴニストもしくはアゴニストは、トランスフェリン受容体、またはヘプシジンタンパク質の中央部分（アミノ酸 20 から 50）もしくは C 末端領域（アミノ酸 65 から 84）に対して向けられた抗体であってよい。本発明の一部の実施形態では、ヘプシジンポリペプチドはトランスフェリン受容体のアンタゴニストとして機能できる。本発明のさらにまた別の実施形態では、ペプチドミメティックは、当分野において周知の技術を使用してヘプシジンタンパク質および/またはトランスフェリン受容体のアンタゴニストもしくはアゴニストとして設計できる。

[0081] トランスフェリン受容体のためのリガンドは、アンタゴニストであってもアゴニストであっても、トランスフェリン受容体に結合する能力について本明細書に記載の技術を使用してスクリーニングすることができる。さらに、トランスフェリン受容体へのヘプシジン結合に対する競合は、当分野において周知の技術を使用して実施できる。リガンド、またはより一般的には、ヘプシジンタンパク質に対する結合パートナーは、例えば本明細書に記載の技術を使用して、ヘプシジンポリペプチドの β -2-ミクログロブリンへの複合体化を阻害する能力についてスクリーニングすることができる。

[0082] 本発明の一部の実施形態では、トランスフェリンのアゴニストもしくはアンタゴニストは、同様に、患者の肝細胞またはリンパ球などの細胞内に輸送される鉄の量を増加または減少させるために利用される。例えば、薬物、治療薬、アゴニストもしくはアンタゴニストの有効性は、その調節をインビトロ細胞系中でモニタリングされるスクリーニングプログラムにおいて同定できる。様々な突然変異ヘプシジンタンパク質/ペプチドを発現する宿主細胞系は一次スクリーニング系として使用するために適合する。候補薬は、これらの細胞とのインキュベーションおよびヘプシジン遺伝子に依存する細胞機能を測定することによって、または適正なヘプシジンタンパク質のフォールディングまたはプロセッシングを測定することによって評価できる。そのようなアッセイは、さらにまたヘプシジン遺伝子機能の研究によって決定されるような受容体様活性、鉄輸送および代謝、遺伝子転写またはその他の上流もしくは下流生物学的機能を測定するステップも必要とすることがある。

[0083] あるいは、無細胞系を利用することもできる。精製ヘプシジンタンパク質は、無細胞系中でスクリーニングされる人工の膜もしくは小胞および薬物内で再構成することができる。そのような系はしばしばより便宜的であり、本質的には高スループットタイプのスクリーニングおよび自動化にとってより扱いやすい。

[0084] ヘプシジンタンパク質の純度を決定するための基準には、タンパク質科学の分野にとって標準的な基準が含まれる。これらには、N 末端アミノ酸決定法、一次元および二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ならびに銀染色法が含まれる。精製タンパク質はドラッグデザインにおいて役立つように二次および三次構造の決定に関する研究、そして分子の生物学的機能についてのインビトロ研究において使用するために有用である。

[0085] 本発明の一部の実施形態では、構造の知見および知られているヘプシジンタンパク質の機能相互関係からヘプシジン遺伝子およびヘプシジンタンパク質活性を調節するための薬剤を設計できる。このため、X 線結晶学検査、コンピュータ援用分子モデリング（CAMM）、定量的もしくは定性的構造-活性関係（QSAR）、および類似の工学技術の使用による合理的ドラッグデザインはさらに新薬発見の努力に焦点を合わせることができる。合理的設計は、ヘプシジンタンパク質活性と相互作用してヘプシジンタンパク質活性を修飾できるタンパク質もしくは合成構造の予測を可能にする。そのような構造は、化学合成できる、または生体組織中で発現することができる。このアプローチは、Capsey et al., *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs*, Stockton Press, New York (1988) において検討されている。さらに、コンビナトリアルライブラリーを設計し、合成し、スクリーニングプログラムにおいて使用できる。

[0086] 本発明に基づく、またはそれに由来する治療薬を投与するために、改善された輸送、送達、耐性などを提供するために適切な担体、賦形剤、およびその他の物質を調製物中に組み込むことは理解されるであろう。

7819), hemochromatosis, iron deficiency anemia, hemosiderosis, DNA probes for cDNA screening for specific protein-protein hepcidin cDNA library prepared from human or animal liver tissue from patients suffering from other diseases of liver cirrhosis and described herein are known in the art can be synthesized by standard methods are. These DNA probes are more skilled in the art can be used to isolate the entire family of protein hepcidin genes from cDNA libraries of these proteins using well known methods. For example, Maniatis et al., (1982) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., See the techniques described in Chapter 7.

[0026] hybridization methods are useful for screening of recombinant clones by using a labeled mixed synthetic oligonucleotide probes, each probe is potentially a full complement of the DNA sequence-specific hybridization of non-homogeneous sample containing a mixture of denatured double-stranded DNA. For such screening, hybridization is preferably performed on either a denatured double-stranded DNA or single-stranded DNA. By using stringent hybridization conditions directed to avoid non-specific binding, for example, by hybridization of specific probes for single-stranded target DNA in the mixture that is its full complement which can be visible by autoradiography of DNA clones (Wallace, et al., (1981) *Nucleic Acids Research*, 9:879).

[0027], or by using an antibody to the protein, can be screened indirectly for protein hepcidin protein expression libraries of the invention having at least one epitope possible. Such antibodies may be either polyclonal or monoclonal antibodies can be used to

[0087] 全ての製薬専門家に知られている処方集では極めて多数の調製物を見いだすことができる。Remington's Pharmaceutical Sciences, (15th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)), 特にその中のBlaug, Seymourによる第87章。これらの調製物には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ろう、オイル、脂質、無水吸収基剤、水中油型もしくは油中水型エマルジョン、カーボワックスエマルジョン（様々な分子量のポリエチレングリコール）、半流動ゲル、およびカーボワックスを含有する半流動混合物が含まれる。

[0088] 上記の調製物は、調製物中の活性物質がその調製物によって不活化されない、そしてその調製物が生理学的に適合性であることを条件に、本発明による治療および療法において適切な可能性がある。

[0089] 本発明は、本明細書に記載の実施形態には限定されず、本発明の範囲から逸脱せずに修飾または変更することができる。

[0090] ヒト肝組織および組織標本中でのヘプシジンの発現 本研究で使したヒト肝サンプル (n=7) は、肝転移を伴う成人被験者における部分的肝切除術後に入手した。健康組織は、免疫組織化学検査のために4%パラホルムアルデヒド中で固定するか、またはRT-PCR、ウェスタンブロットおよび免疫蛍光分析のために液体窒素中で急速冷凍した。

[0091] モルモット (n=7) およびマウス (n=5) に麻酔をかけ、引き続いて頸椎脱臼によって致死させた。肝臓、骨格筋および心臓からの組織標本を切除し、ウェスタンブロット分析のために液体窒素中で急速冷凍するか、またはパラホルムアルデヒド中で固定した。

[0092] ペプチド合成、免疫方法、および抗体 公表されたプロヘプシジン配列 (Kraus et al., (2000) FEBS Lett. 480, 147-150; Pigeon et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819) から、ペプチドであるヘプシジン (28-47) およびヘプシジン (70-84) を、標準Fmocプロトコル (Cetin et al., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2935-2939) を使用してC末端アミドとして合成した。これらのペプチドはm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを使用してアオガイヘモシアニンへ結合させ、そして2匹のSPFウサギ (Charles River Iffa Credo) を各ペプチドコンジュゲート (Eurogentec社、ベルギー国スラン) により免疫にした。本研究では、ELISAによって力価を試験した後、ヘプシジン (70-84) に対して向けられた [EG (1) - Hep C] ならびに各々ヘプシジン (28-47) に対して向けられたEG (1) - Hep NおよびEG (2) - Hep Nの3種の抗血清を使用した (図1)。(ヘプシジン28-47: PQQ TGQ LAE LQP QDR AGA RA (配列番号3)、ヘプシジン70-84: CGC CHR SKC GMC CKT (配列番号4))。抗血清を生成させるために使用したペプチドエпитープは、BLAST P2探索によって確認されたようにこれまでに報告されたいずれのタンパク質に対しても相同性を提示しなかった。

[0093] あるいはマウスTfR2 (BioTrend社、ドイツ国ケルン) に対するBT-TFR21S抗体は、例えばヒトTfR2-αの対応する領域に対して68%配列相同性を示しているαおよびβアイソフォームへスプライシングしたマウスTfR2-α (TfR2) のマウスの細胞質N末端に対して産生した。例えばFleming et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2214-2219) を参照されたい。この抗体をウサギにおいて生成し、アフィニティ精製した。

[0094] ヒト肝における発現分析 RNA単離は、DNA消化を含むQiagen RNA easyキットを使用して実施した。逆転写 (RT) -PCR分析は、以前に記載のとおり (Kulaksiz et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6796-6801; Kulaksiz et al., (2002) Am. J. Pathol. 161, 655-664)、5'-3' 方向付けに提示された以下のプライマーおよび仕様ヒトヘプシジン (GenBankデータベース受託番号NM0211175)、ヌクレオチド位置147~165および338~316に対応する5'-CTG CAA CCC CAG GAC AGAG-3' (配列番号5)、および5, GGA ATA AAT AAG GAA GGG AGG GG-3' (配列番号6) を使用して実施した。ヌクレオチド位置2496~2515および2694~2675に対応するヒトTfR2 (#AF067864)、5'-GAT TCA GGG TCA G GG AGG TG-3' (配列番号7) および5' - (GAA GGG GCT GTG ATT GAA GG-3' (配列番号8))。94℃、4分間の初期変性後、反応液には35サイクルの次の加熱プログラムを受けさせた。94℃で30秒間、60℃で30秒間、および72℃で30秒間；このプログラムの後には最後に72℃での5分間の鎖延長

detect the presence of the protein expression product to display the protein hepcidin. In general, ?gt11 library, Huynh, et al., (1985) (in DNA Cloning: A Practical Approach, D. M. Glover, ed., 1:49) and the building are screened by immunological methods.

[0028] the occurrence of specific DNA sequence that encodes a protein hepcidin protein, furthermore, (1) isolation of double-stranded DNA sequences from genomic DNA, (2) DNA sequence of chemical production and to provide the necessary codons for the protein can be obtained by.

[0029] polymerase chain reaction (PCR) using the technology for cloning and expression of cDNA subsequent protein-protein hepcidin, it is possible to amplify the individual members of the hepcidin family (For example, U.S. Patent No. 4,683,202; No. 4,683,195 in; No. 4,889,818 in; Gyllenstein et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7652-7656; Ochman et al., (1988) Genetics, 120:621-623; Triglia et al., (1988) Nucl. Acids. Res., 16:8156; Frohman et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998-9002; Loh et al., (1989) Science, 243:217-see 220).

[0030] in order to construct an expression vector containing the translation control signal / coding sequence and appropriate transcriptional protein hepcidin protein or fragments thereof, using methods known in the art can. These methods, in vitro recombinant DNA techniques, methods include recombinant / synthetic techniques and in vivo recombination. For example, Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., See the techniques described in Chapter 12.

ステップが続いた。増幅産物は、臭化エチジウム染色した1.8%の89mM Tris / 89mMホウ酸 / 2mM EDTA (pH 8.3) アガロースゲル上でランさせた。有意なレベルのゲノムDNAの増幅は、適切なコントロールによって排除した。

[0095] HEPG2細胞中での発現分析 ヒト肝臓癌 HepG2細胞をGerman Collection of Microorganisms and Cell Culture (ドイツ国ブラウンシュヴァイク) から入手し、10% (v/v) 熱不活化FBS、ペニシリン (100単位/mL)、およびストレプトマイシン (100mg/mL) を補給したRPMI 1640培地 (Gibco社、ドイツ国カールスルーエ) 中の5% CO₂中において37℃で増殖させた。細胞は、上記のプライマー仕様を使用してRT-PCRによって分析した。免疫蛍光アッセイ顕微鏡検査のためにHepG2細胞をメタノール中で4分間かけて固定したガラススライド上で増殖させ、そしてPBS中の0.5% Triton X-100を用いて透過処理した。ヘプシジン (1:2000) およびTfR2抗体 (1:1000) の60分間に渡るインキュベーション、およびそれに続くCy-3-結合抗ウサギ抗体 (Dianova社、ドイツ国ハンブルク) と一緒にインキュベーション後に、適切なフィルターを使用してOlympus AX70顕微鏡下で免疫染色を調査した。

[0096] 血清、組織およびHEPG2細胞からのヘプシジンおよびTfR2の抽出 ヘプシジンのより大きな起源として、本出願人らは慢性腎不全の患者から収集した血清を使用した。ヘプシジンを抽出するため、0.01N HClを用いて20mLの血清サンプルを1:1に希釈し、濃HClを用いてpH 3.0へ調整した。冷凍組織およびHepG2細胞を0.5M酢酸中で混合し、(Cetin et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91, 2935-2939; Cetin et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 5925-5929) に記載されたように8分間沸騰させた。Ultra-Turraxホモジナイザー (Janke & Kunkel, ドイツ国シュタウフェン) を用いて均質化した後、サンプルは4℃で20分間かけて20,000×gで遠心し、上清を孔径0.45μmのフィルターに通して濾過した。タンパク質を濃縮させるため、血清サンプル、細胞および全組織抽出液をオクタデカシル (C18) Sep-Pakカートリッジ (Waters社、マサチューセッツ州) へ塗布した。カラムを0.01M HClで洗浄し、30% (v/v) の2-プロパノール / 30% (v/v) のメタノール / 0.01M HClを用いて溶離させた (Cetin et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91, 2935-2939)。タンパク質分画を凍結乾燥させ、使用時まで-80℃で貯蔵した。TfR2分析のために、組織および細胞は100mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH 7.4)、10%グリセロール、1% Triton X-100、2mg/mLのロイペプチン、2mg/mLのペプスタチン、および1mMのフッ化フェニルメチルスルホニルを含有するTris-HClバッファー中で均質化させ、そして4℃で30分間にわたり100,000×gで遠心した。

[0097] 免疫ブロット分析 ウェスタンブロット分析のために、タンパク質抽出液は4% (w/v) SDS (Merck社、ドイツ国ダルムシュタット)、50mM Tris-HCl (pH 8.15)、1mM EDTA、3.24mMジチオスレイトール (Roth社、ドイツ国カールスルーエ)、12.5% (w/v) グリセロール (Merck社)、および0.002%プロモフェノールブルー (Merck社) を含むサンプルバッファー中において94℃で7分間インキュベートした。ヘプシジンを検出するために、16.5%トリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲルを公表されたプロトコル (Cetin et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2935-2939; Kulaksiz et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6796-6801; Kulaksiz et al. (2002) Am. J. Pathol. 161, 655-664; Cetin et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5925-5929) によって使用した。TfR2イムノブロットは、8% SDS-ポリアクリルアミドゲルを使用して実施した。電気泳動法後に、半乾式ブロット法によって疎水性フッ化ポリビニリデンを基剤とする膜 (Pall社、英国ボーツマス) 上にタンパク質を移した。これらの膜は、上記の希釈率でヘプシジンまたはTfR2抗体と一緒に一晩インキュベートした。10mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、および0.05% Tween 20を含有するTris-緩衝生理食塩液中で洗浄した後、色原体としてのニトロブルー-テトラゾリウムおよび5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (Sigma社) を使用してアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体 (希釈率1:50,000; Sigma社) とのインキュベーション後に各免疫反応性タンパク質を可視化した。ウェスタンブロット上の免疫反応は、抗体と対応するペプチド免疫原とのブレイクインキュベーション後に特異的に遮断された。第2ヤギ抗ウサギ抗体との公差反応性は、適切なコントロールによって排除した (Cetin et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91, 2935-2939; Kulaksiz et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 6796-6

[0031] in order to express a hepcidin protein or protein fragment that is available to a variety of host expression vector systems. These phage recombinant DNA containing the coding sequence for the fragment or its protein hepcidin protein, microbes such as bacteria that were transformed with the cosmid DNA expression vectors or plasmid DNA; the coding sequence for a fragment, or its protein hepcidin protein Yeast was transformed using expression vectors recombinant yeast containing; expression vector recombinant virus containing the coding sequence for the fragment or its protein hepcidin protein (eg, baculovirus) insect cell systems infected with using; or The recombinant virus expression vectors containing sequences coding for the protein hepcidin protein or fragment thereof (eg, adenovirus, vaccinia virus) and not containing animal cell lines were infected using, but not limited to them.

[0032] The expression elements of these vectors, which differ in their strength and specificity. Depending on the host / vector system used, the expression vector can be used in any of a number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters. For example, when cloning in bacterial systems, bacteriophage λ , plac, ptrp, ptac (ptrp-lac hybrid promoter) may be used, such as inducible promoters such as pL. When cloning in insect cell systems, promoters can be used such as baculovirus polyhedrin promoter. When cloning in mammalian cell systems can be used, such as vaccinia virus 7.5K promoter, adenovirus late promoter or promoter. Promoter, produced by the recombinant DNA or synthetic techniques can be used to provide transcription of the inserted coding

801; Kulaksiz et al. (2002) Am J Pathol 161, 655-664; Cetin et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 5925-5929).

[0098] 免疫組織化学検査および免疫蛍光法 組織を4%パラホルムアルデヒド中で18時間にわたり4℃で固定した。段階的希釈率でのエタノール中での脱水後、標本はパラフィン中に包埋した。パラフィン切片(5μm)をヘプシジン(抗体EG(1)-HepN、EG(2)-HepN、およびEG(1)-HepC、各希釈率1:2000)またはTfR2(抗体BT-TFR21-S、希釈率1:1000)に対して、以前に記載したとりのアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ABC)法およびインキュベーション順序(Kulaksiz et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6796-6801; Kulaksiz et al., (2002) Am. J. Pathol. 161, 655-664)によって免疫染色した。これらの切片は各抗体と一緒に4℃で24時間インキュベートし、次に希釈率1:200のビオチル化抗ウサギIgG(Jackson Immunoresearch社、米国ペンシルベニア州ウェストグループ)と一緒に30分間インキュベートした。これらの切片は次にPBS中で希釈して前形成したビオチン-ペルオキシダーゼ/ストレプトアビジン(Jackson Immunoresearch社)の複合体と一緒に30分間インキュベートした(最終濃度: ビオチン-ペルオキシダーゼ、0.7μg/mL; ストレプトアビジン、5μg/mL)。抗原-抗体結合部位は、0.05M Tris-HCl(pH 7.6)中の0.7mM塩酸ジアミノベンジン/0.002% H₂O₂中での切片のインキュベーションによって可視化された。

[0099] 免疫蛍光顕微鏡検査のために、ヒト肝からの組織切片(2~4μm)はクライオーム(FrigoCut 2800E; Leica社、ドイツ国Nussloch)を用いて調製し、2時間をかけて風乾し、そして低温アセトン(-20℃)中で10分間かけて固定した。二重免疫蛍光標識化は、特異的ヘプシジン抗体(希釈率1:1000)および希釈率1:30の小管P-糖タンパク質(Centocor社、ペンシルベニア州マルヴァー)に対して産生されたモノクローナル抗体C219(id.)を使用して以前に記載されたとおり実施した(Rost et al., (1999) Hepatology 29, 814-821)。各抗血清とのインキュベーション後、マウスおよびウサギIgG(Dianova社、ドイツ国ハンブルク)に対するCy2-(1:200)およびCy3-(1:600)標識抗体とのインキュベーションによって染色を実施した。顕微鏡写真は、デジタルカメラ(color view 12, soft imaging system SIS社、ドイツ国ミュンスター)および分析ソフトウェア(SIS社、ドイツ国ミュンスター)を装備したOlympus AX70顕微鏡を用いて撮影した。

[0100] 特異性コントロール 方法依存性の非特異性は、(Cetin et al., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2935-2939; Cetin et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5925-5929)に記載されたようにコントロールをランすることによって排除した。抗体の特異性は、抗体と同種および異種抗原ペプチドとの前吸着によって試験した(6.25~100μg/mLの抗血清)(Kulaksiz et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6796-6801; Kulaksiz et al., (2002) Am. J. Pathol. 161, 655-664)。抗体と6.25μg/mLという低い濃度での同種抗原との前吸着は肝組織および細胞中での免疫染色を完全に遮断したが、抗体と100μg/mLまでの濃度の異種抗原との前吸着は免疫染色に影響を及ぼさなかった。

[0101] ヘプシジンELISA競合結合アッセイ 血清サンプルは、26例の健常個体(女性13例、男性13例、年齢26~64歳、平均43歳)、透析療法を受けた患者(15例)および受けていない患者(20例)を含むHFEにおけるC282Y突然変異に対するHHホモ接合性を備える患者35例(女性14例、男性21例、年齢23~82歳、平均54歳)、ならびに長期的血液透析を受けている腎不全の患者59例(女性33例、男性26例、年齢26~96歳、平均57歳)から入手した。サンプル収集中には、患者が感染しないように細心の注意を払った。腎不全症群の患者19例は、最大値11g/dlのヘモグロビン値を特徴とする腎性貧血を有していた。慢性腎不全症を有する全患者は、3,000IEの組換えヒトエリスロポエチン(EPO)を用いて週2~3回治療した。10mLの血液サンプルは氷温血清チューブ内に採取し、4℃で10分間、2,500×gで遠心した。測定は、40mM Tris-HCl(pH 7.3)、100mM NaClを含有するTris緩衝生理食塩液(TBS)中に1:4000で希釈したウサギ抗ヘプシジン抗体EG(2)-HepNで被覆された(200μL/ウェル)96ウェルマイクロタイタープレートを使用して2回ずつ実施した。様々な量の合成ペプチド(0, 20, 100, 500, および1,000ng/mL)またはヒト血清サンプルを含有する標準物質50μLと、N末端がビオチル化されたヘプシジン(28-47)(Peptide Specialty Laboratories社、ドイツ国ハイデ

sequence for the protein hepcidin protein or fragment thereof further.

[0033] in yeast, can use a number of vectors containing constitutive or inducible promoters. Introduction is about, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, (1988) Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. and Wiley Interscience Ch. 13; Grant et al., (1987) Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu and Grossman, (1987) Acad. Press, N. Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, (1986) DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D. C. Ch. 3; and Bitter, (1987) Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger and Kimmel, Acad. Press, N. Y., Vol. 152, pp. 673-684; The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, and, (1982) Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. See I and II. To assay complementation in yeast, the cDNA for fragment thereof protein hepcidin protein, yeast episomal plasmids to replicate autonomously in yeast due to the presence of a circle 2 micro yeast (YEp) is cloned into the can. An array of protein hepcidin protein or fragments thereof may be cloned behind either a promoter or an inducible promoter such as GAL configuration, such as yeast or the LEU2 ADH (Cloning in Yeast, Ch.3, R. Rothstein (1986) In DNA Cloning Vol.11, A Practical Approach, Ed.DM Glover, IRL Press, Wash., D.C.). The construct may not contain untranslated region and 3'5' mRNA-protein hepcidin protein mRNA or protein corresponding to the yeast gene cognate protein hepcidin. YEp plasmid was transformed with high efficiency, these plasmids are extremely stable. Alternatively, the vector may be used to facilitate the integration of foreign DNA sequences into the yeast

ルベルク) 150 μ Lとを各ウエルに添加し(2 ng / ウエル)、室温で1時間インキュベートした。TBST (0.05% Tween 20を含むTBS)を用いて洗浄した後、ビオチニル化抗原-抗体複合体は、基質のテトラメチルベンジジン (DRG Instruments社、ドイツ国マールブルク)を用いてストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ酵素 (Dako社、ドイツ国ハンブルク)によって検出された。呈色反応は1M H_2SO_4 を用いて停止させ、この溶液の吸光度を波長450 / 630 nmで読み取った。

[0102] 当該の4つの群中で測定したヘプシジン値をEXCELのスパッドシート内に入力し、SAS WIN Version 8.2を使用して評価した。測定値は、診断グループ毎の次の要約統計量: 観察回数、相加平均、標準偏差、最小値、中央値、および最大値によって要約した。可能性のある群間差はペアワイズWilcoxon U検定を用いて分析した。有意性レベルは5% (0.05)に設定した。プロヘプシジンと鉄、フェリチンまたはトランスフェリンとの相関関係はSpearman順位相関によって分析した。

[0103] 肝およびHEPG2細胞中のヘプシジンおよびTFR2の発現 RT-PCR分析は、ヘプシジンがヒト肝で発現することを証明した (Gehrke et al. (2003) Blood MS#2002-11-3610, R2)。同様に、192-bpの予測されたPCR産物がHepG2細胞 (コントロール) 中で検出されたが、これらは既にヘプシジンを発現することが証明された (Pigeon C et al. (2001) J Biol Chem 276, 7811-7819; Gehrke et al. (2003) (図2A)。さらに、RT-PCR分析は、TfR2がヒト肝およびHepG2細胞中で発現することを明確に解明した (データは示していない)。

[0104] ウェスタンブロット分析では、全ヘプシジン抗体 [EG (1)-HepN、EG (2)-HepN、およびEG (1)-HepC] は一致してヒトおよびモルモット肝の抽出液中で~10 kDaの免疫反応性バンドを同定した。この肝ペプチドは、HepG2細胞のホモジネート中でヘプシジン抗体によって認識された免疫反応性バンドと共移動した (図2B~D)。全抗体は、さらにまたヒトおよびモルモット肝抽出液もしくはHepG2細胞抽出液を負荷した全レーンにおいて~20 kDaで免疫反応性タンパク質を同定した。骨格筋抽出液 (コントロール) のウェスタンブロット分析は、10 kDaの免疫反応性バンドも20 kDaのバンドも示さなかった (図2B~D)。TfR2抗体BT-TFR21-Sを用いたウェスタンブロット分析は、マウス肝の抽出液中で予想された (Fleming et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2214-2219) ~105 kDaタンパク質の染色を生じさせた。ヒト肝およびHepG2細胞の抽出液中では、~95 kDaの免疫反応性TfR2および少ない程度で~105 kDaの免疫反応性タンパク質が同一抗体によって認識された (データは示していない)。心臓 (コントロール組織) 中では、免疫反応性は検出されなかった。

[0105] HEPG2細胞中の免疫蛍光 エピトープ特異的抗ヘプシジン抗体を使用して、HepG2細胞中のヘプシジンペプチドの発現を免疫蛍光分析により調査した。全抗体は同様に、強力な免疫反応性を生じさせたHepG2細胞中でヘプシジンを同定した (図3)。ヘプシジンの細胞局在に一致して、TfR2抗体は同一細胞中でTfR2を検出した (データは示していない)。

[0106] ヘプシジンおよびTFR2の細胞局在および細胞内局在 様々な領域特異的抗体を用いた免疫組織化学的試験は一致して、ヘプシジンをヒト肝の肝細胞へ局在化した (図4)。クッパー細胞、内皮細胞、胆管、および血管系ではヘプシジン免疫反応性は完全に欠如していた。同一抗体は、モルモット肝においても強度のヘプシジン免疫反応性を検出した (図4)。肝小葉はヘプシジン免疫反応性に関して不均一であった。肝小葉内では、ヘプシジン免疫反応性細胞は主として門脈周囲に位置しており、ヘプシジン陽性細胞の頻度は門脈三管から中心静脈に向かって連続的に減少した (図5)。顕著にも、ヘプシジン陽性細胞間には明確な細胞間の相連が存在した。大多数の肝細胞はヘプシジンに対して強度に陽性であったが、他の肝細胞はほんのかすかな染色しか示さなかった、またはヘプシジンに対して完全に非反応性であった (図5)。細胞内レベルでは、免疫組織化学によってヘプシジン免疫反応性は肝細胞の側底 (=洞様) 膜ドメインに限定された。各細胞の頂端膜ドメインでは免疫反応性は見いだされなかった (図2)。同様に、免疫蛍光分析は側底膜ドメインでヘプシジンに対する強力な免疫反応性を証明した; 小管P-糖タンパク質に対して産生されたC219抗体を用いた二重染色によって明らかになったように頂端膜ドメインからの免疫反応性は見られなかった (Rost et al. (1999) Hepatology 29, 814-821) (データは示していない)。

[0107] ヘプシジンの局在に対応して、タンパク質特異的抗体BT-TFR21-Sはヒトおよびマウス肝中でTfR2を検出した。細胞レベルでは、TfR2は肝細胞の側底膜で見いだされたが、これは免疫反応性の強度に関する明確な細胞間の相連を明らかにした (データは示していない)。不均質性は肝小葉内でも観察され、中心静脈から門脈三管に向かって免疫反応性が増加した。

chromosome.

[0034] A particularly good expression system can be used to express a hepcidin protein or protein fragment that is an insect system. In one such system, the nuclear polyhedrosis virus *Autographa californica* (AcNPV) is used as a vector for heterologous gene expression. Viruses, cells growing in *Spodoptera frugiperda*. Protein coding sequence of hepcidin protein or fragments thereof, non-essential region of the virus (for example the polyhedrin gene) AcNPV promoter cloned in (polyhedrin promoter) can be placed under control. Successful insertion of recombinant virus polyhedrin gene nonobstructive (ie, virus lacking the proteinaceous coat encoded by the polyhedrin gene) give rise to production. These recombinant viruses are used to infect *Spodoptera frugiperda* cells in which the inserted gene is expressed below. (Eg, Smith et al., (1983) J. Biol., 46:586; Smith, see U.S. Patent No. 4,215,051). In addition, materials and methods for baculovirus insect cell expression system / is, for example by Invitrogen (San Diego, California, USA) (MaxBat (TM) kit) can be commercially available in kit form from, such methods Summers and Smith are incorporated herein by reference, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) has been described as well-known in the art. As used herein, an insect cell expression of hepcidin may be a polynucleotide of the present invention has been transformed.

[0035] when used as an adenovirus vector expressing the complex transcriptional / translational control, such as adenovirus late promoter and leader sequence triplets coding sequence of hepcidin protein or protein fragment that can be ligated to the body. This

[0108] ヒト血漿中のヘプシジンプロペプチドの検出 特異的N末端ヘプシジン抗体EG

(2) -HepNを用いて、高い再現性および感受性を備える安定性プロヘプシジンELISAアッセイ(DRG Instruments社、ドイツ国マールブルク)が開発された。図6から明らかなように、ELISAは、ヒト血清中のプロヘプシジン濃度が決定される範囲である4から400 ng/mLまでの間の最高解像力を示した。特異性コントロールとして、異種ペプチドを用いてELISAにおけるインキュベーションを実施した。異種ペプチドを使用したときに、交差反応性は観察されなかった。

[0109] 血中のプロヘプシジンの存在は、ウェスタンブロット分析により確認された。全ヘプシジン抗体は、ヒト血清の抽出液中で肝組織およびHepG2細胞抽出液中の免疫反応性ヘプシジンと一緒に正確に移動した~10 kDa分子量の単一ヘプシジン免疫反応性バンドを同定した(図2、B~D)。

[0110] ELISAの特性 このアッセイの感受性は3.95 ng/mLであった。最も低い標準物質(20 ng/mL)との重複は見られなかった。ゼロ標準物質に溶解させたヒトプロヘプシジンの連続希釈液は90.6~111.6%の範囲内の回収率でプロヘプシジンELISAの検量線と平行にランした。予測濃度からの観察されたパーセンテージとして表示した回収率は91.8%から105.7%であった。アッセイ範囲の全域で試験したプロヘプシジンの3種の濃度で良好な精度が証明された(全CV<10%)。

[0111] 遺伝性ヘモクロマトーシス、慢性腎不全症および腎性貧血中のプロヘプシジンレベル 高感受性ヘプシジンELISAを使用して、51.6~153.4 ng/mL(血清)(平均値±SE; 106.2±32.1 ng/mL)の範囲内のプロヘプシジンが健康志願者26例のコントロール群中で検出された(図7、表1)。HH患者では、プロヘプシジンの濃度は12.1から153.9 ng/mL(血清)(平均値±SE; 70.2±38.1 ng/mL)であった。これらの濃度は、コントロール被験者の濃度と比較して有意に低かった(P<0.05)(図7、表1)。CRIに罹患している患者の血清中のプロヘプシジン濃度は31.1から471.3 ng/mL(平均値±SE; 148.1±88.0 ng/mL)まで変動し、コントロール被験者(P<0.01)およびHH(P<0.001)における濃度と比較して有意に増加した。これとは対照的に、RAを有する血液透析患者中のプロヘプシジンレベル(115.0±53.1 ng/mL; 範囲、20.5~252.4 ng/mL)(P=0.05)はCRI患者と比較して有意に低下した(図7、表1)。

[0112] プロヘプシジンと鉄、フェリチンまたはトランスフェリン飽和との間で、本出願人らのサンプル(HH、CRI、およびRAからの血清)中で有意な相関は見いだされなかった(図8)。ゼロからの差についての試験は有意性を示さなかった。

[0113]

表1 ヘアでのU検定の結果(P値)

	慢性腎不全	腎性貧血	ヘモクロマトーシス
コントロール	0.0419	0.6131	<0.0005
慢性腎不全		0.23	<0.001
腎性貧血			0.002

[0114] 考察 特異的プライマーを用いたRT-PCR分析は、ヘプシジンが、多くの態様において正常肝細胞の生理学を示している明確に分化した肝細胞癌細胞系であるHepG2細胞(コントロール)中で高濃度に発現することを証明した(Adenot et al. (1979) Nature 282, 615-616)。HepG2細胞中に上首尾で使用された適切なプライマー仕様および組み合わせを使用して、RT-PCR試験はヒト肝中でのヘプシジンの発現を確認した。ヘプシジン前駆体分子中の様々なエピトープを認識する3種の相違する抗体(図1)は、ウェスタンブロット分析によっても、HepG2細胞中だけではなく、2つの種であるヒトおよびモルモットの肝抽出物中でも、~10 kDaの免疫反応性ペプチドを同定した。この免疫反応性ペプチドの見かけの分子量は、cDNA配列からのヘプシジンプロホルモンに対して推定された予測分子量にしたがっている(Pigeon et al. (2001) J Biol Chem 276, 7811-7819)(図1)。興味深いことに、~20 kDaの第2免疫反応性バンドはHepG2細胞ならびにヒトおよびモルモット肝の抽出物中で全ヘプシジン抗体によって検出されたが、コントロール組織中では欠如していた。この免疫反応性タンパク質は、ダイマータイプのヘプシジンを反映する可能性がある。実際には、以前の研究では、凝集特性および可能性のあるマルチマーの形成がヘプシジン-25については記載されているがヘプシジン-20については記載されていない(Hunter et al. (2002) J Biol Chem 277,

chimeric gene can then be inserted in the adenovirus genome by in vitro or in vivo recombination. Non-essential region of the viral genome (eg, E3 or E1 regions) into the insert is made of growth in a host infected with recombinant viruses that can cause you to express the protein hepcidin protein or fragments thereof, and Arrow. (Eg, Logan and Shenk, (1984) Proc.Natl.Acad.Sci., (USA) See 81:3655-3659). Or it may have been used vaccinia 7.5K promoter. (Eg, Mackett et al., (1982) Proc.Natl.Acad.Sci., (USA) 79:7415-7419; Mackett et al., (1984) J. Virol. 49:857-864; Panicali et al., (1982) Proc.Natl.Acad.Sci., 79:4927-see 4931).

[0036] for efficient translation of coding sequences or fragments thereof are inserted protein hepcidin protein may require a specific initiation signal. These signals include the initiation codon and adjacent sequences ATG. When inserted into a suitable expression vector containing the full genome protein hepcidin protein initiation codon and adjacent sequences that specific, potentially eliminating the need for additional translational control signals. However, not only part of the inserted protein hepcidin protein coding sequence, must be provided exogenous translational control signals including the initiation codon ATG. Furthermore, the initiation codon must be in phase with the reading frame of protein coding sequence of hepcidin protein or fragments thereof in order to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational control signals and initiation codons, these may be derived from various origins of both natural and synthetic. Expression efficiency, the appropriate transcription enhancer elements can be enhanced by including transcription terminators, etc. (eg, Bitter

37597-37603)。

[0115] 領域特異的および分子ドメイン特異的ヘプシジン抗体を用いた免疫細胞化学的研究は、既に分子生物学技術によって証明されたように、これらの細胞中でのヘプシジンの発現を示す Hep G2 細胞中の強力な免疫反応性を解明した (Gehrke et al., (2003) Blood MS#2002-11-3610, R2)。これらの様々なヘプシジン抗体を使用した免疫組織化学的および免疫蛍光検査は、ヒトおよびモルモット肝中で、ヘプシジンが特に主として門脈三管の周囲に位置する肝細胞中に特異的に局在することを示した。ヒトおよびモルモット肝中だけではなく Hep G2 細胞中での様々な領域特異的抗体による一致した染色は、肝細胞がヘプシジンの起源であることを指摘している。ヘプシジン免疫反応性は門脈周囲帯から中心静脈に向かって減少した。この門脈小葉内での帯域は、門脈周囲肝細胞が腸から鉄豊富な血液を輸送する門脈静脈への初回通過アクセスを有するので、機能的有意性を有する可能性がある。顕著にも、ヘプシジンの発現または分泌における細胞間の相違を反映する可能性があるヘプシジン免疫反応性の密度に関してヘプシジン陽性細胞間には明確な細胞間の相違が存在した。

[0116] 細胞内レベルでは、ヘプシジンは肝細胞の側底膜ドメインに集中していた。頂端膜ドメインでは、免疫反応性は見いだされなかった。細胞内レベルでのヘプシジンの離散的な分布パターンからは、ヘプシジンの肝洞様血管内への遊離が側底膜へ向けられたことを推論できる。この指向性の分泌経路はヒト血清中でのヘプシジンプロホルモンの検出 (図1) によって追加して立証された (下記参照)。その結果、これらの所見はプロヘプシジンの分泌を介して内分泌療法で鉄代謝を調節できるというさらなる証拠を提供している。

[0117] T f R 2 ならびに各標的膜ドメインの発現および細胞分布を分析するために、細胞レベルでの RT-PCR、ウェスタンブロットおよび免疫組織化学的研究を実施した。以前の研究で証明されたように、RT-PCR 分析は T f R 2 がヒト肝中で高度に発現することを解明した。(Fleming et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2214-2219)。このタンパク質の存在は、ヒトおよびマウス T f R 2 に対して特異的な B T - T F R 2 1 - S 抗体を使用してウェスタンブロット試験によって確認された。~105 kDa の免疫反応性タンパク質はマウス肝抽出物中で検出された。免疫反応性 T f R 2 のこの分子量は予想された 95 kDa (Fleming et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2214-2219) よりわずかに大きく、以前に記載されたように (Kawabata et al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 16618-16625) 何らかの翻訳後修飾を表す場合がある。しかし同一条件下で、T f R 2 - 抗体は予想分子量 95 kDa のタンパク質およびヒト肝抽出物中では低い親和性を備える 105 kDa タンパク質を同定した。ヒトおよびマウス肝のイムノブロット間の矛盾は、種間の相違に起因すると考えられる。

[0118] 免疫組織化学的検査は、T f R 2 がヒトおよびマウス肝の肝細胞に局在することを解明した。ヘプシジンの細胞分布に一致して、タンパク質特異的抗体は T f R 2 を排他的に側底膜に局在化した。このタイプの T f R 2 の膜特異的関連は特に、二鉄トランスフェリンに結合して血液から肝細胞内へのトランスフェリン結合鉄の取り込みを媒介することによって鉄代謝に関係している、T f R 2 の側底膜活性化を支持している (Philpott, C. C. (2002) Hepatology 35, 993-1001; Subramaniam et al., (2002) Cell Biochem. Biophys. 36, 235-239)。注目すべきことに、ヘプシジンについて記載されたものに類似する小葉帯域が T f R 2 について観察され、免疫反応性は門脈周囲帯から中心静脈に向かって減少した。

[0119] 細胞レベルでのヘプシジンと T f R 2 との相互作用が以前の研究で考察されているので (Nicolas et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8780-8785; Frazer et al., (2002) Gastroenterology 123, 835-844)、Hep G2 細胞一明確に分化した肝細胞癌細胞系 (Aden et al., (1979) Nature 282, 615-616) 中のヘプシジンと T f R 2 との共在が分析され、多くの態様において正常肝細胞の生理学的性質が証明された。ヒト肝中で使用されて成功した適切なブライマー仕様および組み合わせを使用する RT-PCR 試験は、Hep G2 細胞中のヘプシジンおよび T f R 2 の発現を同定した。翻訳レベルでは、Hep G2 細胞中のヘプシジンおよび T f R 2 の存在は、肝組織由来の対応する免疫反応性バンドと共移動する正確な分子量の免疫反応性タンパク質バンドを生じたウェスタンブロット試験によって確認された。Hep G2 細胞中の各タンパク質の共局在化は、対応する領域特異的および分子ドメイン特異的抗体を使用する免疫細胞化学によって特に実証された。全抗体は、Hep G2 細胞中のヘプシジン標識化を証明しており、これらの細胞中の顆粒免疫反応性パターンを解明し、これは電子顕微鏡によって肝細胞中で既に証明されている小さな分泌小胞へのペプチドの局在化を推測させる (Schwartz et al., (1985) EMBO J. 4, 89

et al., (1987) Methods in Enzymol., 153:516-See 544).

[0037] Furthermore, regulating the expression of the inserted sequences, it is possible to select a host cell modification and processing of a particular gene product or the desired way. Expression is driven by certain promoters, certain inducers (eg, zinc and cadmium ions for metallothionein promoters) can be increased by the presence of. Therefore, the expression of hepcidin protein or fragments thereof produced by recombinant proteins can be controlled. If this is lethal to the host cell is a cloned heterologous gene protein product is important. In addition, for the function of the protein product of protein modification (eg, glycosylation) and processing (eg, cleavage) may be important. Various host cells have characteristic and specific mechanisms for post-translational processing and modification of proteins. To ensure accurate modification and processing of heterologous proteins expressed can select the appropriate cell lines or host systems.

[0038] containing the coding sequence of the protein hepcidin protein or fragments thereof, host cells expressing the gene product of hepcidin protein or fragments thereof biologically active protein and at least can be identified by four general approaches. (A) DNA-DNA hybridization; (b) "marker" presence or absence of gene function; (c) assessment of the level of transcription as measured by the expression of mRNA transcript protein hepcidin protein in host cells; and (d) Detection of protein gene product hepcidin protein or its biological activity as measured by immunoassay.

[0039] in a first approach, the presence of protein coding sequence of hepcidin

9-904)。TfR2は、固有の分布パターンを伴って、HepG2細胞へ免疫細胞化学的に局在化された。

[0120] 転写レベルおよび翻訳レベルでの本試験データに基づくと、ヘプシジンおよびTfR2は肝臓内で共発現し、肝細胞の側底膜ドメインに共局在化される。細胞レベルでのTfR2およびヘプシジンの一致する局在化に加えて、門脈周囲帯における集中した免疫反応性および中心静脈に向かって減少する染色を伴う肝小葉内のこれらの分子の類似の分布もまた検出された。共通（側底）膜ドメインおよびそれらの類似の小葉帯域におけるこれらのタンパク質の調整発現は、調節性ペプチドホルモンヘプシジンとTfR2を介してのトランスフェリン結合鉄の取り込みとの形態機能的結合を支持している。実際に、様々なデータがヘプシジンとTfR2との相互作用を実証している。第一に、おそらくはTfR2によって感知されるトランスフェリン飽和における変化は肝性ヘプシジンの発現を調節する（Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001）。第二に、ヒト肝上での定量的RT-PCR分析から明らかのように、TfR2の肝性発現はトランスフェリン飽和によって調節されるヘプシジン発現と有意に相関している（S. G. Gehrke, H. Kulaksiz et al., 未公表データ）。第三に、ヘプシジンおよびTfR2は共通細胞膜ドメインに共局在しており、突然変異の症例ではTfR2（Fleming et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10653-10658）およびヘプシジン（Nicolas et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8780-8785）の発現を無効にする部位である門脈周囲帯における強力な免疫反応性を伴う同様の小葉分布を明らかにしているが、ヘプシジン（Zhou et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2492-2497; Levy et al., (1999) *Blood* 94, 9-11）およびB2m（Santos et al., (1996) *J. Exp. Med.* 184, 1975-1985）の肝性鉄過負荷も発生する。第四に、TfR2遺伝子における突然変異はヘモクロマトーシスを引き起こすと報告された（Camasehella et al., (2000) *Nat. Genet.* 25, 14-15）。これは、顕に鉄吸収の上昇を生じさせる減少したヘプシジン発現の結果として発生する可能性がある（Nicolas et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8780-8785）。

[0121] HepG2細胞中のヘプシジンおよびTfR2の同時の存在およびそれらの肝臓内での共通する極性局在および小葉分布は、ヘプシジンがトランスフェリン飽和によって調節され、そして順にヘプシジン発現を変調させるTfR2へ形態機能的に結合した内因性肝性ペプチドであることを指示している。そこで、ヘプシジンのシグナル経路に関する研究から関連する所見が得られると予想される。

[0122] 肝臓などの血液形成組織および鉄貯蔵部位は食事性鉄に対する身体を指示する腸細胞シグナルを送る（Philpott C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001）、ヘプシジンは肝細胞から分泌され、腸性鉄吸収を調節する候補シグナル因子である。しかし本発明の以前には、血液中における一定の分子形態のヘプシジンの存在については論争があった（Krause et al. (2000) *FEBS Lett* 489, 147-150; Park et al. (2001) *J Biol Chem* 276, 7806-7810; Hunter et al. (2002) *J Biol Chem* 277, 37597-37603）。

[0123] ヘプシジンのプロホルモンが血液中に分泌されるかどうかを分析するため、そして健康志願者および様々な疾患を有する患者のヒト血清中のプロヘプシジンレベルの範囲を評価するために、ヘプシジンプロホルモンに対して産生されたN末端抗体EG(2)-HepNを適用することによってELISAが開発された。C末端抗体EG(1)-HepCはドットプロット（データは示していない）、ウェスタンブロット、免疫組織化学、および免疫蛍光の実験（図1-4）において特異的結果を明らかにしたが、ELISAでは免疫反応性を入手することはできなかった。ヘプシジンの緻密なフォールディングパターンおよびその三次構造は、EG(1)-HepC抗体が循環中ヘプシジンを同定する能力がないことの原因である可能性がある。

[0124] 抗体EG(2)-HepNを用いたELISAは3.95 ng / ウエルの検出限界をもつ高再現性、安定性および感受性ならびに4から400 ng / mLの範囲内の強力な分解能を特徴とした。この範囲はヘプシジン濃度が決定された範囲であった。健康個体（n=26）由来のヒト血清中で、プロヘプシジンは51.6から153.4 ng / mL（平均値±SE: 106.2±32.1 ng / mL）の範囲内で測定されたが、これは知られている調節性ペプチドホルモンの濃度に匹敵しており、ヒト尿中のヘプシジン濃度より約11倍高い（Park et al. (2001) *J Biol Chem* 276, 7806-7810）。興味深いことに、測定された濃度は、このペプチドが強力な調節を受ける可能性があることを示す広範囲のプロヘプシジンを示した。

protein or fragment thereof that is inserted into an expression vector, as described in recent years substantially (Pigeon et al., (2001) *J.Biol.Chem.*276, 7811-7819) DNA using a probe containing a nucleotide sequence that is homologous to specific portions or hepcidin protein coding sequence of the protein-DNA hybridization can be detected by.

[0040] in the second approach, based vector / host expression of recombinant certain "marker" gene functions (eg thymidine kinase activity, resistance to the antibody, resistance to methotrexate, transformed phenotype, and occlusion body formation in baculovirus) can be identified and selected based on the presence or absence. For example, when inserted within a marker gene sequence of the vector coding sequence of the protein hepcidin protein or fragments thereof, can identify a recombinant fragment containing the coding sequence of hepcidin protein or proteins by the absence of marker gene function. Or, if you put in parallel with the protein coding sequence of hepcidin protein or fragment thereof under the control of the same or different promoter used, the marker gene is able to control the expression of hepcidin coding sequence. Marker expression in response to induction or selection, suggests that the protein expression of hepcidin protein coding sequence.

[0041] in the third approach can be assessed by hybridization assays for the transcriptional activity of protein coding region of the hepcidin protein or fragments thereof. For example, RNA is substantially (Pigeon et al., (2001) *J.Biol.Chem.*276,7811-7819) or those with certain parts of the protein coding sequence of hepcidin protein or

[0125] cDNA構造は、ヘプシジンが、20～25アミノ酸ペプチドへN末端でプロセシングされる84aaプレプロペプチドとして翻訳されることを示唆している(Park et al., (2001) (図1および9))。単一配列開裂部位に対する強力なコンセンサス配列は60残基プロペプチドを生じさせるであろうGly²⁴とSer²⁵との間に位置するが、以前の研究は肝組織および血液のような天然起源からより大きなプロペプチドを単離することに失敗した(Park et al., (2001))。技術的困難に加えて、肝臓中の豊富なプロペプチドコンバーターゼは一定のプロペプチドの単離を阻害することがある。これに関連して、近年の研究は、血液(Krause et al., (2000) FEBS Lett 489, 147-150)および尿(Park et al., (2001) J Biol Chem 276, 7806-7810)中において2つの研究グループによって記載されたヒトにおけるヘプシジンの循環形態がこのタンパク質のC末端20-25アミノ酸から構成されることを証明している。しかし、本発明のELISA測定はヘプシジン前駆体のN末端に対して産生された特異的抗体を用いて実施され、これは20-25アミノ酸のプロセシングされた形態の他に、ヘプシジンプロホルモンが分泌され、ヒト血液中で循環することを示している。実際に、血液中へのプロヘプシジンの潜在的遊離がウェスタンブロット分析によって確認された。全ヘプシジン抗体はヒト血清の抽出液中で肝臓およびHepG2細胞の組織抽出物中の免疫反応性ヘプシジンと一緒に正確に共移動した~10kDaの単一ヘプシジンバンドを同定した(ポジティブコントロール; 図1)。10kDaより小さいヘプシジンフラグメントは検出されなかった。ヒト血清中のプロヘプシジンの存在は、肝細胞が内分泌経路を介する食事性鉄吸収を減少させる可能性があるヘプシジンのプロホルモンを分泌することを示している。

[0126] 鉄過剰を有する患者におけるヘプシジンの有意性を分析するために、本発明は検査下の全HH患者において検出される鉄過剰の典型的特性を有するHFEにおけるC282Y突然変異に対してホモ接合性であるHH患者35例の血清中のヘプシジン濃度を提供する。ヘプシジン濃度は、以前に想定されたように腸性鉄吸収を減少させるためにこれらの個体においては増加しなかった(Fleming and Sly (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 8160-8162)。HH患者の血清中のプロヘプシジンレベルは、非処置患者においてだけではなく、週1回の滴血療法を受けている個体においても予想外にダウンレギュレートされた。健康志願者と比較して、プロヘプシジン濃度は106.2から70.2 ng/mL (血清)へ顕著に低下した。処置および非処置HH患者間で相違は観察されなかった。これらの所見は、肝ヘプシジン発現がhfeノックアウトマウス(Ahmad et al., (2002) Blood Cells Mol Dis 29, 361-366; Muckenthaler et al., (2003) Nat Genet 34, 102-107)およびHFE関連性ヘモクロマトーシス患者においては有意に低下していることを証明した以前のHH試験と一致している。それらはさらに一次肝細胞およびHepG2細胞の鉄負荷がヘプシジンmRNAをダウンレギュレートすることを証明しているインビトロ試験とも一致している(Gehrke et al., (2003) Blood MS#2002-11-3610, R2; Nemeth et al., (2003) Blood 101, 2461-2463)。鉄吸収がHHでは鉄過剰にもかかわらず強化され(Pietrangelo A., (2002) Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol 282, G403-414; Philpott C. C., (2002) Hepatology 35, 993-1001; Anderson and Powell (2002) Int J Hematol 76, 203-207)、そして構成性ヘプシジン発現はヘモクロマトーシスのマウスモデルでは鉄過剰を防止するので(Nicolas et al., (2003) Nat Genet 34, 97-101)、HH患者ではヘプシジン調節は中断されると想定される。低下した濃度のヘプシジンは、明らかに上昇した腸性鉄吸収を十分に阻害することはできない。さらにこれらの所見は、肝ヘプシジン発現がhfeノックアウトマウス(Ahmad et al., (2002) Blood Cells Mol Dis 29, 361-366; Muckenthaler et al., (2003) Nat Genet 34, 102-107)およびHH患者(Bridle et al., (2003) Lancet 361, 669-673)においては有意に低下しているという所見に基づくと、鉄過剰にもかかわらずHHにおけるプロヘプシジンアップレギュレーションの欠如は、HFEが血清中ヘプシジンレベルの調節に関係している可能性があることを指摘している。

[0127] 以前の研究は尿によるヘプシジン排泄が血清中フェリチン濃度と明確に相関することを証明しているが(Nemeth et al., (2003) Blood 101, 2461-2463)、本研究では、HHもしくは透析患者における循環中プロヘプシジンと血清中鉄もしくはフェリチンレベルとの間で相関関係は見いだされなかった。同様に、プロヘプシジンと、肝ヘプシジンの発現を調節すると言われていた(Gehrke et al., (2003))トランスフェリン飽和との間の相関関係も検出されなかったが、検査下のHH患者はヘプシジンに影響を及ぼすパラメーターを表す貧血、低酸素症または炎症の影響を受けなかった。これらのデータは、鉄貯蔵による血清中のプロヘプシジンレベルの調節が複雑な間接的作用を含むことを示唆している(Nemeth et al., (2003) Blood 101, 2461-2463)。

fragments thereof, as listed in can be isolated and analyzed by Northern blot using a probe homologous. Alternatively, it is possible to extract and assayed for total nucleic acid hybridization of the host cell for such probes.

[0042] in the first four approaches, the expression of the protein product of the hepcidin protein or fragments thereof, eg Western blot, radioimmunoprecipitation, by immunoassay, such as immunization immunoassay enzyme-linked can be evaluated mathematically.

[0043] is identified as expressing the recombinant protein hepcidin protein or fragments thereof, shall be analyzed for gene product. This is a physical product that can be achieved by assays based on immunological or functional properties. For example, the methods of the invention is cultured under conditions allowing the expression of hepcidin protein encoded by a host cell proteins containing a suitable expression vector containing a hepcidin polynucleotide of the invention, hepcidin contains a process for producing a protein. Protein hepcidin protein from the culture, conveniently from the culture medium, recovered from lysates prepared from host cells or can be further purified. The preferred embodiment includes the embodiment is in the form of the protein or mature form of full-length protein produced by such processes.

[0044] The present invention further provides an isolated protein hepcidin protein variants encoded by the modified nucleic acid fragment or nucleic acid fragment of the invention of the present invention. "Modified variant" is a nucleic acid fragment of the invention (ie, ORF) and are different nucleic acid sequences, which meant a

[0128] ヘプシジンは尿からも単離されているが、本発明は腎不全症患者におけるヘプシジン調節の評価を提供する。HH患者および健康被験者とは対照的に、CRI患者の血清中の免疫反応性プロヘプシジン濃度は健康被験者における106.2 ng/mLから148.1 ng/mLへ有意に増加した。透析患者における増加したプロヘプシジンレベルは、腎臓が循環中ペプチドの代謝および/または排出に関与している可能性を示唆している。しかし、尿中ヘプシジンは血液から濾過されるだけであるのか、または腎臓起源であるのかについては現在不明である。本発明に基づく、ヘプシジンは腎尿細管細胞中でも見いだされたので (Kulaksiz et al. (2003)、未公表データ)、ヘプシジンが少なくとも一部には腎臓から遊離されることを排除できない。

[0129] 本発明は、正色素性、正球性赤血球を特徴とする進行性腎不全の明確に認識された合併症であるRAを有する透析患者におけるプロヘプシジン血清中レベルの決定を提供する。健康被験者と比較して、免疫反応性プロヘプシジン濃度はRA患者においては有意に高くなかった (平均値、115.0 ng/mL)。ペプチドホルモンの蓄積をもたらすこれらの患者における末期腎不全にもかかわらず、プロヘプシジンレベルは貧血を伴わない透析患者におけるより有意に低かった (平均値、148.1 ng/mL)。本発明から、RAにおけるヘプシジン調節は炎症または肝細胞腫瘍の貧血におけるヘプシジン調節とは相違すると結論される。RAにおけるプロヘプシジンのダウンレギュレーションは、腸による鉄吸収および細網内皮系マクロファージからの鉄遊離を強化させるためのペプチドの反応性の生理的変動を反映している。本発明は、プロヘプシジンがEPO療法にもかかわらず貧血を伴わないCRI患者群では増加することを提供する。そこで、ヘプシジンが失血のためにRAでは減少すると結論され、これがヘプシジンのダウンレギュレーションの理由である可能性がある (Nicolas et al. (2002) J. Clin. Invest 110, 1037-1044)。

[0130] 本発明は、ヒト血清中のプロヘプシジンレベルを測定するためのELISAを提供する。このアッセイは非侵襲性である上に容易に実施することができ、したがってルーチン作業のために適切である。プロヘプシジンアッセイは、その精度、感受性、再現性およびヒト血清サンプルのヘプシジン (28-47) の正確な決定に基づいている。本ELISAの適用は、数種の鉄代謝障害に罹患している患者におけるプロヘプシジンの検出および決定を初めて可能にする。様々な鉄の状態におけるプロヘプシジン作用の正確な分子機序を同定するためにはより詳細な研究が必要とされる。本発明は、さらにまたヘプシジンのアゴニストおよびアンタゴニストが鉄障害の予防および治療における潜在的薬物であることを提供する。

[0131] ヘプシジンの役割を理解するためには、ペプチドの細胞起源およびシグナル経路についての知識が必須である。この点に関し、本発明は、肝細胞の側底膜ドメインに局在している部位であるヒトおよびモルモット肝中のヘプシジン免疫反応性について記載する。以前の研究は、これらの細胞と吸収性腸細胞との間に関連がある推測していた (Hunter et al., (2002) J. Biol. Chem., M205305200; Anderson et al., (2002) Biochem. Soc. Trans. 30, 724-726)。本発明は、ヒト血漿中でのプロヘプシジンの検出について記載し、それにより、内分泌経路を介する食事性鉄吸収を減少させ得るヘプシジンのプロホルモンを、肝細胞が分泌することを示す。さらに、ヘプシジンはHepG2細胞中で検出され、その細胞中に新規発見のトランスフェリン受容体タイプ2も見いだされた (データは示していない)。

[0132] ヒトまたは動物の血清およびその他の体液中におけるヘプシジンの定量的測定のための酵素イムノアッセイ 本発明の1つの実施形態では、ヘプシジン酵素イムノアッセイ (「EIA」) が使用される。EIAは、競合原理に基づく固相酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) である。96ウェルマイクロタイタープレートのマイクロタイターウェルは、ヘプシジン (28-47) に対して向けられたポリクローナルウサギ抗ヘプシジン抗体で塗布される。サンプル中に存在する未知量のプロヘプシジンおよびビオチン分子と共役結合した固定量のヘプシジン (28-47) は、ウェル上に固定されたヘプシジン抗体の結合部位を得るために競合する。1時間のインキュベーション後、競合反応を停止させるためにマイクロタイタープレートが洗浄される。引き続きインキュベーション後に、結合ビオチン分子がストレプトアビジンホースラディッシュペルオキシダーゼを用いて検出される。1時間半のインキュベーション後、プレートは2回洗浄される。基質溶液を添加した後、ヘプシジン濃度は測定された光学密度と反比例している。

[0133] 材料: ウェルを抗ヘプシジン抗体で塗布したマイクロタイターウェル (96ウェル); 試薬: ビオチンコンジュゲート (ビオチンにコンジュゲートしたヘプシジン) 7 mL; 基準標準物質セット、各1.0 mL; 0, 20, 100, 500, 1,000, 2,000 ng/mL; プロヘプシジンコントロール、低および高、2バイアル (凍結乾燥物); 試薬: 酵素複合体 (ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートしたストレプトアビジン (「HRP」)) 14 mL; 試薬: 基質溶液 - HS-TMB, 14 mL; 停止液、0.5 M H₂SO₄, 14 mL; 洗浄液、40x、30 mL; マイクロタイタープレート

nucleotide sequence encoding the same protein fragment because of the degeneracy of the genetic code, however. Preferred nucleic acid fragments of the invention, which encodes a protein which is Orb.

[0045] protein hepcidin protein of the present invention can be purified from the cells was varied to express a hepcidin protein or protein addition. As used herein, the cells usually it through genetic engineering cells that do not produce, normal cells or desirable if the will be to produce a protein hepcidin protein produced at a low level be varied so as to express a polypeptide or protein. The skilled artisan, to adopt easy way to express and introduced into prokaryotic or eukaryotic cell either an array or synthesized recombinantly to purify the cells that produce the protein hepcidin protein of the invention can.

[0046] protein hepcidin protein of the present invention is still further as a product of transgenic animals, characterized by somatic or germ cells containing a nucleotide sequence encoding a protein, for example protein hepcidin transgenic bovine, goat, pig, can also be expressed as a constituent of milk or sheep.

[0047] protein hepcidin protein can also be produced by known conventional chemical synthesis. How to build a protein hepcidin protein of the invention by synthetic means known to those skilled. Protein sequence hepcidin protein was constructed by synthesis method is the primary quality and hepcidin native protein, by sharing the characteristic conformation and / or tertiary structure secondary has biological properties in common with them, including the protein activity potential. So they are

リーダー (45 ± 10 nm) (例、DRG Instruments 社マイクロタイタープレートリーダー)；50 および 100 μL のディスポーザブルチップを備える精密マイクロピペット；標準型の冷蔵庫；吸収紙；脱イオン水。

[0134] この実施形態を好ましい材料に関して記載してきたが、本発明の分野における当業者であれば本発明において他の材料を使用できることを理解するであろう。例えば、当業者は、本発明においてビオチン / ストレプトアビジン以外の相補的結合成分ならびにホースラディッシュペルオキシダーゼ / 過酸化水素以外の酵素 / 基質の組み合わせを使用できることを理解するであろう。

[0135] 貯蔵条件 2 ~ 8 °C で貯蔵したときに、未開封試薬は使用期限までは反応性を維持するであろう。この期限の経過後に試薬を使用しないこと。マイクロタイターウエルは 2 ~ 8 °C で貯蔵しなければならない。ホイル包装が開封されると、再度密に閉鎖するために注意を払わなければならない。塗布されたマイクロタイターウエルの免疫反応性は、開封されているが、乾燥剤を含有する緊密に閉鎖されたプラスチック製ファスナー付きパウチ中で約 6 週間安定性である。

[0136] 標本の収集および調製 本アッセイでは、ヒトまたは動物の血清または EDTA 血漿を使用しなければならない。生物学的サンプルの特別な前処理は不要である。生物学的サンプルは 24 時間までは 2 ~ 8 °C で貯蔵することができるが、これより長期間については -20 °C 以下で冷凍しなければならない。肉眼的に溶血した、または肉眼的に脂肪血性である標本は使用しないこと。その他のサンプル材料については、特別な抽出プロトコールが必要になることがある。

[0137] アッセイの性能：一般の所見 全ての試薬および標本は、使用前に室温にしなければならない。全ての試薬は、泡立たせずに混合しなければならない。

[0138] テストがいったん開始されると、全ステップを中断せずに完了しなければならない。

[0139] 交差汚染を回避するためには、各試薬、標準物質または標本に対して新しいディスポーザブルのプラスチック製ピペットチップを使用すること。基質溶液および停止液を分注するためには、金属製パーツを備えるピペットを避けること。

[0140] 標準物質およびサンプルをウエルの底部にピペットで移す。酵素コンジュゲートおよび停止液をピペットで添加するためには、ピペットをウエルの上方で垂直位置に保持し、酵素コンジュゲートとサンプルまたは標準物質との、および停止液と基質溶液との完全な混合が達成されるように、ウエルの中心に相当する溶液を分注する。

[0141] アッセイを開始する前に、全試薬を用意し、キャップを取り外し、必要な全てのウエルをホルダー内に固定することなどが推奨される。これは中断せずに各ピペット操作ステップを実施するために同等の経過時間を保証するであろう。

[0142] 一般的に、酵素反応は時間および温度と線形に比例している。これは一定の物理的・化学的条件のために内挿を可能にする。試験ランにおいてゼロ標準物質の吸光度が 1.0 未満またはマイクロタイタープレート分光計の性能上限より上方にある場合は、色の最終酵素的形成のインキュベーション時間を 30 もしくは 10 分間へ延長または短縮することができる。各ランにおいてキャリブレーションがアッセイされるので、吸光度の変動は結果に影響を及ぼさない。

[0143] 基質液は無色またはかすかなブルーもしくはグリーンでなければならない。この溶液がダークブルーである場合、試薬は使用不能なので廃棄しなければならない。

[0144] 基質溶液とのインキュベーション中には、マイクロタイタープレート上への直射日光を回避すること。

[0145] 試薬の調製 基準標準物質およびコントロール：1.0 mL の二重蒸留水を用いて標準物質 / コントロールバイアルの凍結乾燥内容物を再構成する。注意：再構成した標準物質 / コントロールは 2 ~ 8 °C で 6 日間は安定である。より長期間にわたり貯蔵するためには -20 °C で冷凍する。洗浄液：40 倍に濃縮した洗浄液（含量：3.0 mL）へ脱イオン水を添加して最終量を 1200 mL とする。希釈洗浄液は、室温で 2 週間は安定である。

[0146] アッセイ方法 所望の数の被覆されたストリップをホルダー内に固定する。50 μL のヘプシジン標準物質を適切なウエル内に分注する。50 μL のサンプルを選択したウエル内に分注する。50 μL のビオチンコンジュゲートを各ウエル内に分注する。プレート

biologically active hepcidin in the quality of the natural purified protein in immunological processes for generating and screening antibody therapeutic compounds can be used as substitutes or immunological.

[0048] protein hepcidin protein of the present invention can be prepared by culturing transformed host cells under culture conditions suitable for expression of recombinant proteins. Expressed protein hepcidin resulting protein is then purified using known processes such as gel filtration and ion exchange chromatography, from such culture (ie, from culture medium or cell extracts) to give possible. Purification of the protein hepcidin protein affinity column that contained a substance that binds to a protein, concanavalin A-agarose, heparin-toyopearl (trademark) Cibacrom blue 3GA Sepharose or (TM) one or more over the affinity resin, such as column step, phenyl ether, butyl ether, one or more steps including hydrophobic interaction chromatography resin is used, such as ether, or may include further or immunoaffinity chromatography.

[0049] Alternatively, the protein hepcidin protein of the present invention can be expressed in a form that facilitates further purification. For example, it is maltose binding protein (MBP), glutathione-S-transferase (GST) or thioredoxin (TRX) fusion proteins, such as a fusion protein can be expressed as a His tag. Kits for expression and purification of such fusion proteins, Inc. New England BioLab (Beverly, Mass.), Inc. Pharmacia (Piscataway, NJ), commercially available from Invitrogen Corporation, and each. Protein hepcidin protein epitope tagging for one further be purified by using a specific antibody directed to such epitope

10 秒間、完全に混合する。このステップで完全に混合することが重要である。室温で60 分間インキュベートする。ウェルの中身を力強く振とうする。希釈洗浄液を用いてウェルを3 回すすぎ洗いする(1 ウェル当たり400 μ L)。残っている液滴を取り除くために吸収紙上でウェルを激しくぶつける。全ウェルに100 μ L のストレプトアビジンHRP 複合体を添加する。室温で30 分間インキュベートする。ウェルの含量を元々よく振とうする。希釈洗浄液を用いてウェルを3 回すすぎ洗いする(1 ウェル当たり400 μ L)。残っている液滴を取り除くために吸収紙上にウェルを激しくぶつける。指定時間間隔で、各ウェルに100 μ L の基質溶液を添加する。室温で15 分間インキュベートする。ステップ10 と同一時間間隔で各ウェルに100 μ L の停止液を添加することにより酵素反応を停止させ、 450 ± 10 nm で各ウェルの吸光度を決定する。

[0147] 最終反応安定性 ステップ15 から30 分間以内にウェルを読み取ることが推奨される。結果の計算 450 ± 10 nm で吸光度を決定できるあらゆるマイクロウェルリーダーを使用できる。各サンプルのテストステロン値を以下のとおりに入手する。a. 線形-線形または半対数グラフ用紙を使用して、各基準標準物質の平均吸光度(Y)をその対応する濃度(X) (ng/mL) に対してプロットすることによって検量線を構成する。検量線を構成するためには、4 パラメーターロジスティック関数を推奨する。b. 必要であれば初期サンプル希釈率を掛けることによって、この検量線からの単純な内挿によって各サンプルの平均吸光度を使用して対応するテストステロン値を決定する。

[0148] DRG ELIZAMAT 3000 およびDRG 回帰プログラムは、読取りおよび4 パラメーターロジスティック関数を使用したコンピュータ援用解釈を可能にする。

[0149] 検量線の例 以下のデータは証明することだけを目的としており、アッセイ時点のデータ生成の代わりに使用することはできない。

[0150]

標準物質	450nm での OD (光学密度)
標準物質0 (0ng/mL)	1.79
標準物質1 (20ng/mL)	1.67
標準物質2 (100ng/mL)	1.33
標準物質3 (500ng/mL)	0.82
標準物質4 (1,000ng/mL)	0.61
標準物質5 (2,000ng/mL)	0.43

[0151] 性能特性: 感受性 図6は、ng/mL 単位でのヘプシジン(28-47)の濃度および波長450 nmでのELISA 溶液の吸光度を示している循環中ヒトプロヘプシジン検量線に対する代表的ELISAを示している。

[0152]

subsequently. One such epitope ("FLAG (registered trademark)") is by Kodak (New Haven, CT) from commercially available.

[0050] or part of a protein activity (eg, receptor binding to Tfr2, hepcidin, such as binding to a specific antibody) is expected to maintain the screening or other immunological it can be easily prepared and skilled in the art that the disclosure herein are also subject to other fragments and derivatives of the array / protein peptide hepcidin protein is useful for mathematical methods. Such modifications are encompassed by the invention.

[0051] protein hepcidin protein or fragment thereof, or of the entire gene sequence resulting from expression of the gene sequence is part of it, ligated to direct the production of chimeric protein or The resulting gene sequences or two or more should be regardless of immunoreactivity. This reactivity, radioimmunoprecipitation, competitive radioimmunoassay method can be evidenced by standard techniques such as immunoblot, or immunological.

[0052] If you use a variety of methods known in the art production of antibodies that define the protein hepcidin protein or fragment thereof, the central part of the protein hepcidin protein (amino acids 20 to 50) or the C-terminal epitope (amino acids 65 to 84) that can produce antibodies against. Hepcidin specific antibodies bind to these epitopes, the sequence is known and does not bind the other. Such an antibody, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, single chain antibodies, and include the Fab and Fab expression library fragments, but not

表2 方法フローシート DRGヘプシンELISAキット

内容	標準物質/ サンプル μL	ビオチンコン ジュゲート μL	ストレプトアビ ンHRP 複合体 μL	基質溶液 μL	停止液 μL	
標準物質0	50	50	100	100	100	マイクロ タイター プレート リーダー を用いて 450nmで ODを読 み取る。
標準物質1	50	50	100	100	100	室温で15 分間イン キュベー トする。
標準物質2	50	50	100	100	100	
標準物質3	50	50	100	100	100	
標準物質4	50	50	100	100	100	
標準物質5	50	50	100	100	100	
標準物質6	50	50	100	100	100	
サンプル1	50	50	100	100	100	
サンプル2	50	50	100	100	100	
サンプル3	50	50	100	100	100	
サンプル4	50	50	100	100	100	
サンプル5	50	50	100	100	100	

limited to them. In order to produce antibodies, the rabbit, a mouse, can be immunized by injection for protein hepcidin protein or synthetic protein hepcidin protein specific host animal variety is not limited to them, including rats. In order to increase the immunological response, depending on the host species, the Freund's (complete and incomplete) adjuvant, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active agents such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions peptides, emulsion, oily blue guy hemocyanin, dinitrophenol, BCG and (bacille Calmette-Guerin) can use various adjuvants are not limited to them, including a human adjuvants such potentially useful, such as corynebacterium parvum and.

[0053] polyclonal antibodies, for example horses, cows, various birds, rabbits, mice, can be easily generated from the skilled person, such as a variety of warm-blooded animals or rats. Briefly, hepcidin, such as an intraperitoneal adjuvant or incomplete Freund's complete adjuvant, intramuscular, intraocular, used to immunize animals or through subcutaneous injection. After several booster immunization, serum samples are collected are tested for reactivity to hepcidin. Particularly preferred polyclonal antisera will give rise to signal at least three times higher than background in one of these assays. When you reach a plateau titer for reactivity to hepcidin, animal blood once a week, easily available from a large number of antisera can be either by exsanguination or animals.

[0054] Monoclonal antibodies against peptides of hepcidin may be prepared by using any technique that provides the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, Kohler and Milstein, (Nature,

[0153] 分析感受性は、平均値からゼロ標準物質の21回の反復分析 (n = 21) の2 S

D (SD = 0.055) を差し引くことにより計算した。

[0154] このアッセイの感受性は 3.95 ng/mL であった。このアッセイの直線性は、相違するヘプシジンレベルを有するサンプル（血清）をゼロ標準物質で希釈することによって評価した。希釈サンプル中のヘプシジン含量を ELISA によってアッセイした。各サンプルおよび回収率 (%) については 3 種の希釈率を計算した。

[0155]

平均値 (ng/mL)	591.6	157.5	179.4
平均回収率 (%)	99.1	107.9	104.6
回収率 (%) の範囲	90.6~108.2	106.3~107.2	92.3~111.6

[0156] ヘプシジンの分析的回収率は、血清サンプル中の 3 種の濃度で推定した。様々な初期ヘプシジン濃度を備えるサンプルへ、非標識ヘプシジンの量を増加させながら (50 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL) 添加した。各サンプル（スパイクされていない、スパイクされている）をアッセイした。ヘプシジン濃度を測定し、回収率 (%) を計算した。

[0157]

平均値 (ng/mL)	273.8	116.8	82.3
平均回収率 (%)	93.1	94.7	97.1
回収率 (%) の範囲	91.8~94.3	89.2~98.7	94.5~105.7

[0158] アッセイ内精度（ラン内）変動は、相違するヘプシジン含量を含む 3 つのコントロールサンプルの反復測定 ($n=12$) によって決定した。サンプル 1: 平均値 = 426.7; SD = 20.2; CV (%) = 4.69 サンプル 2: 平均値 = 210.7; SD = 8.58; CV (%) = 4.07 サンプル 3: 平均値 = 110.7; SD = 4.74; CV (%) = 4.28

[0159] アッセイ間精度（ラン間）変動は、3 種の相違するロットのキット中の相違する 3 つのコントロールサンプル ($n=23$) の反復測定 ($3 \times$) によって決定した。サンプル 1: 平均値 = 431.96; SD = 20.8; CV (%) = 4.82 サンプル 2: 平均値 = 216.17; SD = 14.44; CV (%) = 6.68 サンプル 3: 平均値 = 109.8; SD = 10.72; CV (%) = 9.76

[0160] ヒト腎臓中のヘプシジンの発現 ヘプシジンは遠位尿管管中で発現し、尿中に遊離される。鉄ホメオスタシスは食事性鉄の吸収によって主として消化管内で制御されると広く考えられている。しかし、近年の研究は腎臓もまた鉄代謝に関係することを証明している。鉄調節性および抗菌性ペプチドであるヘプシジンはヒト尿から最初に単離されたので、本出願人は哺乳動物の腎臓におけるヘプシジンの細胞局在および細胞内局在を調査し、血清および尿中のプロヘプシジン濃度を分析するために ELISA アッセイを開発した。

[0161] ヘプシジンの発現および細胞局在は、ヘプシジン特異的ポリクローナル抗血清を用いてヒト、マウス、およびラット腎において RT-PCR、ウェスタンブロット、および免疫細胞化学検査によって証明された。その血清中および尿中濃度は感受性 ELISA によって決定された。

[0162] ヘプシジンは、ヒト、マウス、およびラット腎中で発現する。領域特異的抗血清を用いたウェスタンブロット分析は、プロヘプシジンの見かけの分子量に対応する ~9.5 kDa のペプチドを同定した。局在試験は、ヘプシジンが腎皮質および腎の髄質外層中の遠位尿管管で発現することを明らかにした。細胞内レベルでは、ヘプシジンは尿中での追加の存在に基づいて、明白に尿中へ頂端で遊離される分泌性尿管管細胞の頂端膜ドメインに局在する。上昇したレベルのプロヘプシジン (156.8 ng/mL、健康志願者 104.2 ng/mL) は CRI 患者において決定されたが、これは腎臓が循環中ホルモンを代謝および/または排泄できることを示している。

(1975) 256:495-497) was first described by hybridoma technology, more recent human B cell hybridoma technique (Kosbor et al., (1983) Immunology Today, 4: 72) EBV-hybridoma technique (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96) including but not limited to them. In an additional embodiment of the present invention is a monoclonal antibody specific for the / protein peptide hepcidin protein is produced in animals can be sterilized using the recent engineering (PCT/US90/02545). According to the invention, human antibodies can be used, and by using human hybridomas (Cote et al., (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.,80:2026-2030) or using the EBV virus in vitro by having it transformed human B cells (Cole et al., (1985) in, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp.77-96) available. In fact, the present invention, "chimeric antibodies" techniques developed for production (Morrison et al., (1984) Proc.Natl.Acad.Sci., 81:6851-6855; Neuberger et al., (1984) Nature,312:604-608; Takeda et al., (1985) Nature,314:452-454), together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity includes, appropriate antigen specificity available by splicing the genes from a mouse antibody molecule comprises. Such antibodies are the result of the present invention.

[0055] According to the invention, techniques described for producing single chain antibodies in order to produce single chain antibodies specific for protein hepcidin protein (U.S. Patent 4 No. 946,778) can be adapted.

[0056] Additional embodiments of the present invention, Fab expression library that allows quick and easy identification of

[0163] 哺乳動物の腎臓中でのヘプシジンの発現から、本出願人らは鉄調節性ホルモンであるヘプシジンが内因性腎ペプチドであり、ヘプシジンは腎によって排泄 / 代謝されるだけではなく、腎尿管系においても合成かつ尿中へ管腔を通して遊離されると結論する。腎臓中のヘプシジンの局在は、このペプチドが腎尿管系において調節的役割を果たすことを意味している。

[0164] 緒言 近年の研究は、HFE-関連性ヘモクロマトーシスにおける異常なヘプシジン発現 (Muckenthaler et al., (2003) Nat Genet, 34: 102-107) および中断したヘプシジン調節 (Bridle et al., (2003) Lancet, 361: 669-673; and Kulaksiz et al., (2003) Gut, 近刊) ならびにヘプシジン突然変異と重度の若年性ヘモクロマトーシス (Roetto et al., (2003) Nat. Genet., 33: 21-22) との関連を見いだした。これらの観察所見に基づくと、ヘプシジンが小腸における鉄吸収およびマクロファージからの鉄遊離の負の調節因子として作用する鉄ホメオスタシスにとって重要な構成要素であることが示唆されている (Nicolas et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 4596-4601)。

[0165] 大多数の研究はヘプシジン産生の主要部位である (Park et al.; Kulaksiz et al., (2003) Gut, 近刊) 肝臓中でのヘプシジンの調節および機能に集中しているが、このペプチドが腎臓および尿管においても役割を果たす可能性があるという指摘も集まっている (Id., Wareing et al., (2003) Am J Physiol Renal Physiol, 印刷に先行する電子出版; および Ferguson et al., (2003) Kidney Int., 64: 1755-1764)。鉄ホメオスタシスは食事からの取り込みレベルでは主として消化管内で制御されると広く考えられている。生体中には鉄の分泌経路がないというのが現在の定説である。しかし、近年の研究は腎臓が鉄のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすことを証明している (Wareing et al., (2003) Am J Physiol Renal Physiol, 印刷に先行する電子出版; Ferguson et al., (2003) Kidney Int, 64: 1755-1764; および Gunshin et al., (1997) Nature, 388: 482-488)。糸球体による限外濾過によって有意な比率の血清中の鉄を入手することができ、糸球体で濾過された鉄の大多数は再吸収される (Wareing et al., (2000) J Physiol, 524, 2: 581-586)。

[0166] したがって、ヘプシジンが局所ペプチドとして腎臓内にも存在するかどうかを分析するのは合理的である。このため、本出願人らはヘプシジン前駆体分子の様々なエピトープに対して抗血清を産生し、転写および翻訳レベルで3種の哺乳動物種について調査した。本出願人らの所見は、腎臓における血清中ヘプシジンの排泄の他に、このペプチドが哺乳動物の腎の遠位尿管細胞中の内因性ホルモンとしても産生され、尿中に管腔を通して遊離されることを示しており、これは腎臓および / または尿管中でのヘプシジンの調節的役割を意味している。

[0167] 材料および方法 組織および組織の調製: 本研究で使したヒト腎サンプル (n=5) は副腎腫を有する成人患者における腎切除術後に入手した。本研究で使したヒト肝サンプル (n=7) は肝転移を伴う成人患者における部分的肝切除術後に入手した (Kulaksiz et al., (2003) Gut, 近刊)。健康組織を免疫組織化学検査のためには4%パラホルムアルデヒドまたはブアン固定液中で固定するか、またはRT-PCRおよびウェスタンブロットのためには液体窒素中で急速冷凍した。ラット (n=5) およびマウス (n=5) に麻酔をかけ、引き続いて頸椎脱臼によって致死させた。腎臓および肝臓からの組織標本を切除し、RT-PCRまたはウェスタンブロット分析のためには液体窒素中で急速冷凍するか、またはパラホルムアルデヒド中で固定した。

[0168] ペプチド合成、免疫方法、および抗体: 公表されたプロヘプシジン配列 (Krause et al., (2000) FEBS Lett. 480, 147-150; Pigeon et al., (2001) J Biol Chem 276, 7811-7819) から、ペプチドであるヘプシジン (28-47) およびヘプシジン (70-84) を、標準Fmocプロトコール (Kulaksiz et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 6796-6801; and Kulaksiz et al., (2002) Am J Pathol., 161: 655-664) を使用してC末端アミドとして合成した。これらのペプチドはm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを使用してアオガイヘモシアニンへ結合させ、そして2匹のSPFウサギ (Charles River-Iffa Credo) を各ペプチドコンジュゲート (Eurogentec社、ベルギー・ボスラン) により免疫した。抗体EG (1) -HepC、EG (2) -HepC [各々プロヘプシジン (70-84) に対して向けられた]、ならびにEG (1) -HepNおよびEG (2) -HepN [各々プロヘプシジン (28-47) に対して向けられた] が生成され、特性付け

monoclonal Fab fragments comprising the desired specificity for / peptide hepcidin protein-protein techniques described in order to build over (Huse et al., (1989) Science, 246:1275-1281) are used.

[0057] Antibody fragments containing specific binding sites on protein hepcidin protein can be generated by known techniques. For example, such fragments, F can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule (ab')₂ F and a fragment (ab')₂ fragment disulfide bridges contain Fab fragments that can be generated by reducing, but not limited to them.

[0058] yet another object of the present invention are diagnostic assays and kits, hemochromatosis, iron deficiency anemia, hemosiderosis, liver cirrhosis, and others described herein is to provide reagents for use in diagnostic assays for detecting protein-protein hepcidin individuals suffering from diseases.

[0059] in the style of this one embodiment of the invention protein-protein hepcidin hemochromatosis, iron deficiency anemia, hemosiderosis, liver cirrhosis and described herein can be used as antigens in immunoassays for the detection of those individuals suffering from other diseases. Protein hepcidin protein of the present invention, the peptides and / or polypeptide, and include a small number, radioimmunoassay, assays enzyme-linked immunosorbent, "sandwich" assay, precipitin reaction assay, immunodiffusion gel diffusion, agglutination assays, fluorescent immunoassays can be used in any immunoassay system known in the art, including but not limited to assay protein A immunoassays and immunoelectrophoresis.

られ、そして使用された (Kulaksiz et al., (2003) Gut、近刊)。

[0169] 腎臓中での発現分析: GenBank cDNA配列に基づいて、以下のプライマーを構築かつ使用した。5' - 3' の方向で与えられるヒトヘプシジン (データベース登録番号: NM021175) 5' -CTG CAA CCC CAG GAC AGA G-3' および 5' -GGA ATA AAT AAG GAA GGG AGG GG-3'; ラットヘプシジン (#NM053469)、5' -ACA GAA GGC AAG ATG GCA CT-3' および 5' -GAA GTT GGT GTC TCG CTT CC-3'; マウスヘプシジン-1 (#NM032541)、5' -CGA TAC CAA TGC AGA AGA GAA GG-3' および 5' -TTC AAG GTC ATT GGT GGG GA-3'。これらのプライマーは以前報告された配列に対する相同性を示さなかった。

[0170] RNA単離は、DNA消化を含むQiagen社製RNAeasyキットを使用して実施した。逆転写 (RT) -PCR分析は、以前に記載のとおり実施した (Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA, 99: 6796-6801; および Kulaksiz et al., (2002) Am J Pathol., 161: 655-664)。94℃、4分間の初期変性後、反応液には30サイクルの次の加熱プログラムを受けさせた。94℃で30秒間、60℃で30秒間、および72℃で30秒間、このプログラムの後には最後に72℃での5分間の鎖延長ステップが続いた。増幅産物は、臭化エチジウム染色した1.8%の89mM Tris / 89mM ホウ酸 / 2mM EDTA (pH 8.3) アガロースゲル上でランさせた。特異性についてのコントロールとして、増幅したPCR産物をMWG-Biotechによってシーケンシングした。

[0171] 免疫ブロット分析: ウェスタンブロット実験を16.5%のトリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル上で実施した。ヒト、マウス、およびラットの腎および肝、ならびにヒト尿由来のタンパク質 (各実験のために50mL) を公表されたプロトコル (Kulaksiz et al., (2003) Gut、近刊; Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA, 99: 6796-6801; および Kulaksiz et al., (2002) Am J Pathol., 161: 655-664) によって抽出した。電気泳動法後に、半乾式ブロット法によって疎水性フッ化ポリビニリデンを基剤とする膜 (Pall社、英国ボートマス) 上にタンパク質を移した。1:1000で希釈したヘプシジン抗体と一緒に膜を一晚インキュベートした。10mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、および0.05% Tween 20を含有するTris-緩衝生理食塩液中で洗浄した後、色原体としてのニトロブルーテトラゾリウムおよび5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (Sigma社) を使用してアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体 (希釈率1:50,000; Sigma社) とのインキュベーション後に免疫反応性タンパク質を可視化した。ウェスタンブロット上の免疫反応は、抗体と対応するペプチド免疫原とのプレインキュベーション後に特異的に遮断された。第2ヤギ抗ウサギ抗体との交差反応性は適切なコントロールによって排除した (Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA, 99: 6796-6801; および Kulaksiz et al., (2002) Am J Pathol., 161: 655-664)。

[0172] 免疫細胞化学的プロトコル: 組織を4%パラホルムアルデヒド中、またはブアン固定液中に4℃で18時間固定し、パラフィン中に包埋した。パラフィン切片 (4~5μm) をヘプシジン (抗体EG (1)-HepN、EG (2)-HepN、EG (1)-HepC、およびEG (2)-HepC、各希釈率1:2000) に対してアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法によって免疫染色した。インキュベーション順序および抗原-抗体結合部位の可視化は以前に詳述したように実施した (Kulaksiz et al., (2003) Gut、近刊; Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA, 99: 6796-6801; および Kulaksiz et al., (2002) Am J Pathol 161: 655-664)。手短には、これらの切片は各抗体と一緒に4℃で24時間インキュベートし、次に希釈率1:200のビオチン化抗ウサギIgG (Jackson ImmunoResearch社、米國ペンシルベニア州ウェストグロブ) と一緒に30分間インキュベートした。これらの切片は次にPBS中で希釈した前形成したビオチン-ペルオキシダーゼ / ストレプトアビジン (Jackson ImmunoResearch社) の複合体と一緒に30分間インキュベートした (最終濃度: ビオチン-ペルオキシダーゼ、0.7μg/mL; ストレプトアビジン、5μg/mL)。抗原-抗体結合部位は、0.05M Tris-HCl (pH 7.6) 中の0.7mM塩酸ジアミノベンジジン / 0.002% H₂O₂ 中で切片のインキュベーションによって検出した。

[0173] 特異性コントロール: 方法依存性の非特異性は、公表されたようにコントロールをラ

Which describes a suitable assay is also mentioned in the patent No. 4,629,783 and U.S. Pat.

[0060] According to the invention, monoclonal or polyclonal antibodies produced against the protein quality of various forms of hepcidin are hemochromatosis, iron deficiency anemia, hemosiderosis, blood to diagnose a patient suffering from other diseases of liver cirrhosis and described herein can be used in immunoassays for the sample of spinal fluid or other body fluids.

[0061] In one embodiment of the present invention, blood samples were collected from the patient through an incision in the vein is brought into contact with an anticoagulant such as EDTA, were mixed, 10-600g min the heart, is taken to be common in the art plasma, or spinal fluid samples are collected from patients by lumbar puncture.

[0062] antibodies described herein, the organization, the basic reagents in a number of different immunoassays to determine the presence of protein-protein hepcidin in the sample of blood or body fluids can be used as. Stated generally, the antibodies may be quantitatively and even qualitatively, can be used in any type of immunoassay. This includes both one-and two-site sandwich immunoassay site non-competitive type of assay, which includes traditional as well as competitive binding assays.

[0063] ease of detection, and particularly preferred because of its quantitative nature and is a sandwich or double antibody assay assay there are many variations, all of which are intended to be encompassed by the invention.

[0064] For example, in a typical forward sandwich

ンすることによって排除した (Kulaksiz et al., (2003) Gut、近刊)。抗体特異性は、抗体と同種および異種抗原ペプチドとの前吸着によって試験した (6.25~100 µg/mL の抗血清) (Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 6796-6801; および Kulaksiz et al., (2002) Am J Pathol 161: 655-664)。抗体と 6.25 µg/mL という低い濃度での同種抗原との前吸着は腎臓中での免疫染色を完全に遮断したが、抗体と 100 µg/mL までの濃度の異種抗原との前吸着は免疫染色に影響を及ぼさなかった。

[0174] ヘプシジンの ELISA 競合結合アッセイ: 血清および尿サンプルを個体 22 例 (女性 11 例、男性 11 例、年齢 23~59 歳、平均 39 歳) から入手し、および血清サンプルは長期血液透析を受けている腎不全症を有する患者 22 例から入手した (女性 11 例、男性 11 例、年齢 25~77 歳、平均 48 歳)。慢性腎不全症を有する全患者は、3,000 IE の組換えヒトエリスロポエチン (EPO) を用いて週 2~3 回治療した。サンプル収集中には、健康志願者および患者が感染も出血もしないように細心の注意を払った。10 mL の血液サンプルは血清チューブ内に採取し、10 mL の尿サンプルは採尿管中に採取し、4℃ で 10 分間、2,500 × g で遠心した。測定は、以前に記載したように (8) 96 ウェルマイクロタイタープレートを使用して 2 回ずつ実施した。手短には、1:4,000 で希釈したウサギ抗ヘプシジン抗体 EG (2) -HepN200 µL / ウェルで、マイクロタイタープレートを被覆した。様々な量の合成ペプチド (0, 20, 100, 500, および 1,000 ng/mL) またはヒト血清および尿サンプルを含有する標準物質 50 µL ならびに N 末端がビオチン化されたヘプシジン (28-47) (Peptide Specialty Laboratories 社、ドイツ国ハイデルベルク) 150 µL を各ウェルに添加し (2 ng / ウェル)、室温で 1 時間インキュベートした。TBST (0.05% Tween 20 を含む TBS) を用いて洗浄した後、基質のテトラメチルベンジジン (DRG Instruments 社、ドイツ国マールブルク) を用いてストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ酵素 (Dako 社、ドイツ国ハンブルク) によってビオチン化抗原-抗体複合体を検出した。呈色反応は 1M H₂SO₄ を用いて停止させ、この溶液の吸光度は波長 450 / 630 nm で読み取った。

[0175] 統計的分析: データは平均値 ± SEM として表示した。統計的分析はスチューデントの t 検定によって評価した。P < 0.05 である差を有意であると見なした。

[0176] 結果 哺乳動物腎臓中のヘプシジンの発現: RT-PCR 分析は、肝臓 (陽性コントロール, Kulaksiz et al., (2003) Gut、近刊を参照) だけではなくヒト、ラットおよびマウス腎においてもヘプシジンの明白な発現を解明した (図 10)。これらの動物種の肝臓 (データは示していない) および腎臓中で、ヒトに対する 192 bp の予想 PCR 産物、マウスに対する 193 bp の産物、ラットに対する 201 bp の産物が検出された。配列分析により、PCR 生成産物が対応するペプチドの cDNA と完全相同性を有することが解明された。

[0177] 翻訳レベルでは、ヘプシジンの存在が領域特異的抗体を用いてのウェスタンブロット試験によって確認された (図 10)。ヘプシジン前駆体分子の C および N 末端に対して向けられた抗血清は一致して、ヒト、ラットおよびマウス腎の抽出物中において ~9.5 kDa の免疫反応性バンドを同定した。

[0178] ヘプシジンの細胞局在: 領域特異的ヘプシジン抗血清を用いた免疫組織化学的試験は、一致してヘプシジンをヒト、マウス、およびラット腎の遠位尿細管中へ局在化した (図 11~15)。近位尿細管、集合管、および糸球体には完全にヘプシジン免疫反応性が欠如していた。免疫反応性遠位尿細管は腎皮質および腎の髄質外層へ限定され、腎の髄質内層はヘプシジンに対する免疫染色を示さなかった (図 11, 12)。注目すべきことに、ヘプシジン陽性尿細管細胞間には明確な細胞間の相違が存在した。大多数の尿細管細胞はヘプシジンに対して強度に陽性であったが、他はほんのかすかな免疫反応性しか示さないか、またはヘプシジンに対して完全に非反応性であった (図 14)。著しくは、調査した全切片において、ヘプシジン抗血清は遠位尿細管を内張りしている上皮細胞の細胞質中で糸球体免疫反応性パターンを明らかにした (図 11, 12)。一部の組織では、ヘプシジン陽性細胞は分泌性細胞の頂極で濃縮した強力な免疫反応性を示したが (図 13, 15)、各細胞の側底膜ドメインでは免疫反応性は見いだされなかった。

[0179] 血清および尿中のヘプシジンプロペプチドの検出: 特異的 N 末端ヘプシジン抗体 EG (2) -HepN を用いて、高い再現性および感受性を備える安定性ヘプシジン ELISA アッセイが開発された (Kulaksiz et al., (2003) Gut、近刊)。図 16 に見られるように、ELISA はヒト血清中にプロヘプシジンが存在することを明らかにした。プロヘプシジンは、健康被験者の血清中で 68.5 から 139.2 ng/mL (平均値 ± SE: 104.2 ± 19.5 ng/mL) の範囲内で測定された。慢性

assay, is fixed on a solid substrate such as a microtiter plate well, eg, unlabeled antibody was bound to be inspected and samples molecule is brought into contact with. Antibodies - After a suitable incubation period is sufficient time to allow the formation of binary complex antigen, secondary antibody is added and labeled with a reporter molecule capable of inducing a detectable signal. Then, the site differs Binding of antigen and antibody in - the antigen - the continuation of the incubation period to allow sufficient time for the formation of a ternary complex of labeled antibody. Unreacted material is washed away, the presence of the antigen is determined by observation of the signal can be quantified by comparison with control samples containing known amounts of antigen. The variation of forward sandwich assay, the assay simultaneous simultaneously added to the antibody binds both the antibody and the sample, is coupled to the first sample to be examined and the labeled antibodies or the incubation, was added to the antibody surface binding of unlabeled and Reverse sandwich assays include the file. These techniques are well known to those skilled in the possibility of small deformations will be readily apparent. As used herein, the term "sandwich assay", which is intended to cover all modifications of the basic two-site method.

[0065] For the sandwich assay of the invention, the only limiting factor in having a different binding specificity of antibodies against both protein-protein hepcidin. So many possible combinations.

[0066] as a more specific example, in a typical forward sandwich assay, the primary antibody covalently to a solid support, which is bound by either or passive. Solid surface is usually glass or polymer, most commonly

腎不全に罹患している患者の血清中のプロヘプシジン濃度は63.9から327.3 ng/mL (平均値±SE: 156.8±61.9 ng/mL) まで変動し、コントロール群における濃度と比較して有意に増加した。

[0180] 感受性ヘプシジンELISAを使用して、プロヘプシジンはコントロール群からのヒト尿中では13.9から456.0 ng/mL (平均値±SE: 180.1±94.8 ng/mL) の範囲内で検出された。ヒト尿中のプロヘプシジンの存在は、さらにウェスタンブロット分析によっても確認された。ヘプシジン抗血清はヒト尿の抽出物中で腎組織中の免疫反応性ヘプシジンと一緒に正確に共移動した〜9.5 kDa 分子量の単一ヘプシジン免疫反応性バンドを同定した(図10)。

[0181] 考察 新規ホルモンであるヘプシジンは抗炎症性ペプチドそして鉄ホメオスタシスの中心的調節因子である(Park et al., (2001) J Biol Chem, 276: 7806-7810; Krause et al., (2000) FEBS Lett, 480: 147-150; Pigeon et al., (2001) J Biol Chem, 276: 7811-7819; Nicolas et al., (2001) Proc Natl Acad Sci USA, 98: 8780-8785; および Nicolas et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA, 99: 4596-4601)。以前の研究では、肝臓がヘプシジンの主要起源であることが証明された(Park et al., CH(2001) J Biol Chem, 276: 7806-7810; および Kulaksiz et al., (2003) Gut, 近刊)。ヘプシジンは最初にヒト尿(Park et al., (2001)) および血液濾液(Krause et al., (2000)) から単離されたが、腎臓ではこの調節ペプチドの発現は検出されなかった(Pigeon et al., (2001))。

[0182] 肝臓で成功した適切なプライマー仕様および組み合わせ(Kulaksiz et al., (2003) Gut, 近刊; および Gehrke et al., (2003) Blood, 102: 371-376) を使用して、本RT-PCR分析は、ヘプシジンが肝臓中だけでなく、ヒト、ラット、およびマウスの3種の哺乳動物種の腎臓中でも発現することを明白に証明した。シーケンシング分析は生成したPCR産物の特異性を解明した。

[0183] 腎臓中の翻訳されたヘプシジンペプチドの存在を検証するために、本出願人らはヘプシジンに対する大量の領域特異的抗血清を産生し、それらをウェスタンブロット分析および免疫組織化学において使用した。ウェスタンブロット分析は、腎臓中でのヘプシジンの発現を確認した。ヘプシジン前駆体分子中の様々なエピトープを認識する4種の抗血清は3種の動物種の腎臓中で〜9.5 kDa の免疫反応性ペプチドを同定したが、これは各cDNA配列から推定されたヘプシジンプロホルモンの分子量に対応する(Pigeon et al., (2001))。この免疫反応性ペプチドの見かけの分子量もまた、肝臓中で検出されたヘプシジンプロホルモンの分子量と一致している(Kulaksiz et al., (2003) Gut, 近刊)。出願人らの所見は、ヘプシジンが腎臓中にも存在するので、ヘプシジンが肝特異的ではないことを明確に証明した。

[0184] 4種の領域特異的ヘプシジン抗血清を用いた免疫組織化学的調査によって、ヒト、マウス、およびラットの腎臓中では、ヘプシジンが腎皮質および髄質外層の尿細管系に特異的に局在することが明らかになった。これらの免疫反応性尿細管は、光学顕微鏡で検出されたそれらの典型的な形態学的特徴によって遠位腎尿細管であると同定された。ヒトにおいてだけではなくマウスおよびラットの腎臓中での様々な領域特異的抗体による一致した染色は、遠位尿細管が腎ヘプシジンの起源であることを指摘している。近位腎尿細管、集合管、および糸球体または腎臓の髄質内層中ではヘプシジンに対する免疫反応性が検出されなかった。

[0185] 腎皮質および髄質外層では、ヘプシジンの免疫反応性は遠位尿細管の上皮分泌性細胞に限定された。注目すべきことに、全ヘプシジン抗血清は糸球体免疫反応性パターンを生じさせたが、これは既に電子顕微鏡によってこれらの細胞中で同定されている各細胞の小さな分泌小胞またはリソソーム中にこのペプチドが局在することを推定させる(van Katchalan MA, Kritiz W; Pathology of the kidney. Edited by JC Jennette, JL Oldson, MM Schwartz, SG Silver: Philadelphia, Heptinstall's, 1998, pp 3-66)。顕著にも、ヘプシジンの発現または分泌における細胞間の相違を反映する可能性があるヘプシジン免疫反応性の密度に関して同一尿細管の上皮細胞間には明確な細胞間の相違が存在した。注目すべきことに、一部の尿細管ではヘプシジンの免疫反応性は上皮細胞の全細胞質中に存在したが、他の尿細管中では強力なヘプシジンの免疫反応性は分泌性細胞の頂極に集中していた。この細胞レベルでのヘプシジンの特有の分布パターンは、ヘプシジンの管腔を介する遊離を前提としている。本出願人ら

used polymers, cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl chloride or polypropylene. The solid support, tube, beads, discs or microplates, may be any other surface suitable for carrying out or immunoassay. Bonding process are well known in the art. Following binding, solid phase - antibody complex is washed in preparation of the test sample. Is added to the complex solid and then aliquots of fluid containing the protein hepcidin protein being examined to allow binding protein hepcidin protein either was presented to the antibody specific for the protein hepcidin protein incubated at 25 ° are enough hours. Complex was added to the solid phase and then secondary antibody, primary antibodies - are incubated at 25 ° enough additional hours to allow antigen binding to the solid phase complex. The secondary antibody was a reporter molecule is bound to appear a second antibody binding to the antigen in the sample using a visible reporter molecule signal. As used herein, the term "reporter molecule", depending on their chemical nature, means a molecule that provides an analytically detectable signal which allows the detection of antigen-binding antibody. Detection, but must be at least equivalent to a quantitative determination of the amount of antigen available in the sample, which can be calculated in absolute terms, which contain normal levels of antigen, or known reference material (or a series of reference materials) can be performed in comparison with.

[0067] reporter molecule most commonly used in this type of assay are either enzymes or fluorescent. In the case of enzyme immunoassay, enzyme, or by periodic acid salts often glutaraldehyde, which will be conjugated to secondary

は、腎尿管細胞の側底膜ドメインではヘプシジン発現を検出できなかった。これは、腎ヘプシジンが尿管を内張している分泌性細胞によって血中に遊離されないことを示唆している。

[0186] 身体の鉄ホメオスタシスの制御は主として近位小腸における食事からの鉄取り込みの緊密な調節に依存すると広く考えられている。しかし、近年の研究は腎臓が鉄ホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすことを証明している (Wareing et al., (2003) *Am J Physiol. Renal. Physiol.*, 印刷に先行する電子出版; Ferguson et al., (2003) *Kidney Int*, 64: 1755-1764; および Gunshin et al., (1997) *Nature*, 388: 482-488)。Wareing および共同研究者らは、代謝的に重大な量の鉄が糸球体で濾過され、実際に尿中へ排泄されるのは濾過された鉄の 0.8-1.5% に過ぎないことを納得できるように証明することができた (Wareing et al., (2000) *J. Physiol.*, 524, 2: 581-586)。そこで、腎尿管に沿って鉄再吸収のための極めて有効な経路があり、強力な調節が行われるに違いない。実際に、Ferguson および共同研究者らは、腎臓の尿管系中で二価金属トランスポーター 1 (DMT-1) を局在することができた (Ferguson et al., (2001) *Am J Physiol. Renal. Physiol.*, 280: F803-F814)。このタンパク質は、消化管による食事性鉄の取り込みのための主要経路であると提案されている (Gunshin et al., (1997))。注目すべきことに、DMT-1 発現は、本出願人らもまたヘプシジンを見いだした場所である腎皮質および髄質外層の尿管細胞の頂端膜ドメインで最高であることが証明されている。さらに、近年の研究は、変化した食事性鉄の摂取が腎 DMT-1 発現を強力に調節することを証明している (Wareing et al., (2003))。ヘプシジン発現が十二指腸 DMT-1 の発現と逆相関していることを証明するこれらの所見およびデータ (Frazer et al., (2002) *Gastroenterology*, 123: 835-844) に基づくと、本出願人らは腎鉄輸送においてヘプシジンが調節性の役割を果たすことを提案している。

[0187] 尿中へのヘプシジンの遊離の可能性は、ウェスタンブロット試験によって実証された。領域特異的ヘプシジン抗血清は、一致して、腎組織抽出物の場合と同様に免疫反応性プロヘプシジンと正確に移動する正確な分子量 (Kulaksiz et al., (2003) *Gut*, 近刊) の強力に標識されたバンドを同定した。これらの所見は、プロヘプシジンが分泌性遠位尿管によって合成され、そこでは尿管タンパク質分解および再循環を免れる尿中へ管腔を通して遊離されることを明らかに示している。ヒト尿中のプロヘプシジン濃度を測定するために、3.95 ng / ウエルの検出感受性を備える高感受性 ELISA を開発した。すでに ELISA 実験 (Kulaksiz et al., (2003) *Gut*, 近刊) で使用されて成功を収めているヘプシジン抗血清 EG (2) - HepN を用いた ELISA 分析は、健康被験者の尿中で 13.9 から 456.0 ng / mL (平均値 \pm SE; 180.1 \pm 94.8 ng / mL) の範囲内の高濃度のプロヘプシジンを明らかにした。この濃度は、同一個人の循環中のプロヘプシジン濃度 (68.5 から 139.2 ng / mL; 平均値 \pm SE; 104.2 \pm 19.5 ng / mL) より相当に高い。注目すべきことに、循環中プロヘプシジンと血清中鉄もしくはフェリチンレベルとの間で相関は見いだされなかった (Kulaksiz et al., (2003) *Gut*, 近刊)。同様に、尿中プロヘプシジンと肝中ヘプシジン発現を調節すると提案されている血清中鉄もしくはフェリチンレベル (Pigeon et al., (2001) *J Biol Chem*, 276: 7811-7819; Nemeth et al., (2002) *Blood*, 101: 2461-2463; および Ganz T, (2003) *Blood*, 102: 783-788) との間でも相関は検出されなかった (データは示していない)。このため、本出願人らは腎 / 尿中プロヘプシジンの調節は血清中鉄もしくはフェリチンによる直接的影響を受けないと提案する。

[0188] 長期的血液透析を受けている腎不全症患者におけるプロヘプシジン調節の評価は、これらの患者の血清中のプロヘプシジン濃度は健康被験者における 104.2 ng / mL から 156.8 ng / mL へ有意に増加することを明らかにした。透析患者における増加したプロヘプシジンレベルは、腎臓がヘプシジンの合成に関係しているだけでなく、それらが循環中ペプチドの代謝および / または排出にも関係している可能性を示唆している。興味深いことに、最新の研究では、腎ホルモンであるエリスロポエチンが肝ヘプシジン遺伝子発現をダウンレギュレートすることが証明されている (Nicolas (2002) *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 29: 327-335)。したがって、透析患者における増加したプロヘプシジン濃度についてまた別の説明は、末期腎不全症において一様に遭遇するエリスロポエチンの相対欠乏性であろう (Eckardt KU, (2000) *Clin. Nephrol.*, 53: S2-8; および Santoro A, (2002) *Rev Clin Exp Hematol*, Suppl 1: 12-20)。しかし、本出願人らはヘプシジン阻害性ホルモンであるエリスロポエチンを用いて治療された慢性腎不全症患者において測定されたプロヘプシジンの増加したレベルを報告しているが、これはヘプシジンの腎濾過を支持している。本発明の 1 つの実施形態は、尿中ヘプシジンが一部は腎臓、そして一部は肝臓を起源とすることを提供する。この

antibodies. As readily recognized, however, and conjugation techniques exist for very wide variety, are well known to those skilled. The enzyme that is commonly used, especially horseradish peroxidase, glucose oxidase, beta-galactosidase and alkaline phosphatase contain. Substrate to be used with a specific enzyme is selected for producing a detectable color change after enzymatic hydrolysis commonly associated. For example, for use with alkaline phosphatase conjugate is p-nitrophenyl phosphate is suitable; for peroxidase conjugates, 1,2 - or toluidine are commonly used phenylenediamine. Furthermore, it is also possible to use a fluorogenic substrate to produce a fluorescent product other than the chromogenic substrates described above. In all cases, the first antibody enzyme-labeled antibodies - protein complexes were added to the protein, hepcidin, that is allowed to bind to the complex, and then excess reagent is washed away. Antibody solution containing a suitable substrate and then - the antigen - that is added to a ternary complex of labeled antibody. The substrate reacts with the enzyme bound to the secondary antibody, caused a qualitative visual signal, which is usually to allow further evaluation of the amount of antigen present in serum samples and quantified by spectrophotometry.

[0068] Alternatively, fluorescent compounds such as fluorescein or rhodamine, may be chemically coupled to antibodies without altering their binding capacity. Lighting and activating it using a specific wavelength of light, a fluorescent dye-labeled antibody absorbs the light energy, inducing a state of excited molecules followed by emission of light at a characteristic longer wavelength. Emission

ため、測定された尿中プロヘプシジンが遊離された腎ペプチドおよび排泄された循環中ペプチドの総計であることに注目しなければならない。

[0189] これらをまとめると、近年の研究は腎臓が鉄ホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすことを証明しているが (Wareing et al., (2003) Am J Physiol Renal Physiol, 印刷に先行する電子出版; Ferguson et al., (2003) Kidney Int, 64: 1755-1764; Gunshin et al., (1997) Nature, 388: 482-488; Wareing et al., (2000) J Physiol, 524, 2: 581-586 および Ferguson et al., (2001) Am J Physiol Renal Physiol, 280: F803-F814)、腎鉄輸送の調節機構についてのデータは存在しない。これに関連して、本出願人らは3種の哺乳動物種の腎臓中で最初にヘプシジンを局在した。本出願人らの所見は、ヘプシジンが肝臓特異的ではないことを示している。腎臓における血清中ヘプシジンの排泄の他に、ペプチドは分泌性腎遠位尿細管中の内因性ホルモンとしても産生され、尿中に管腔を通して遊離されることを示しており、これは腎臓および/または尿管中でのヘプシジンの調節性の役割を意味している。腎尿管系におけるヘプシジンの調節機構は、今後の研究で分析されなければならない。

[0190] ヒト脾臓中のヘプシジンの発現 本研究に使用した脾臓組織は、脾臓癌に罹患している患者におけるホイップル手術後に入手した。肝臓および腎臓で使用されて成功を収めている適切なプライマー仕様および組み合わせを使用して、このRT-PCR分析は、ヘプシジンが肝臓および腎臓中だけではなく、ヒト脾臓中でも発現することを明らかにした。シーケンシング分析は、生成したPCR産物の特異性を解明した。

[0191] 特異的抗体を用いたウェスタンブロット分析は、脾臓中での翻訳レベルでのヘプシジンの発現を確認した。同一抗体を使用して、ヘプシジンは免疫組織化学によって脾臓中で局在化された。パラフィン切片は、ヘプシジンの免疫反応性が脾臓内分泌腺に局在することを明らかにした。脾臓外分泌腺では免疫反応性が見いだされなかった。

appears as a characteristic color visually detectable using light microscopy. Enzyme immunoassay (EIA) as in, fluorescently labeled antibodies are the primary antibody - a protein complex which is bound to protein hepcidin. After washing the unbound reagent, the remaining tertiary complex is exposed to the rays will be the next appropriate wavelength, the fluorescence was observed and noted the presence of the antigen. Immunofluorescence and EIA method has been very well established in the art, both for the present method is particularly preferred. However, radioactive isotopes, other reporter molecules can also be used, such as chemiluminescent or bioluminescent molecules. Skilled in the art how to vary the procedure in order to accommodate the need will be readily apparent to use.

[0069] Alternatively, the sample under test is either human blood or spinal fluid containing protein hepcidin protein can be used in one site immunoassay, the sample to a solid substrate which is deposited in either covalently or noncovalently. High protein hepcidin protein antibody is brought into contact with non-labeled samples on a solid substrate binding. Antibodies - After a suitable incubation period is sufficient time to allow the formation of binary complex antigen, secondary antibody is added and labeled with a reporter molecule capable of inducing a detectable signal then antigen - antibody - the continuation of the incubation period to allow sufficient time for the formation of a ternary complex of labeled antibody. For one site immunoassay, secondary antibodies, the antibodies can be combined with general protein hepcidin antibody is specific for such proteins (ie, heterologous antibodies against immunoglobulins, anti-reporter molecule

specifically bound to - (IgG and IgM) antibodies) may be.

[0070] hepcidin gene (mutated or normal) can be used for the assay of iron metabolism. This gene, together with any accompanying molecules, or without, the human or animal subjects, in primary cells or cell lines derived from healthy subjects, or other organisms (rodents, insects, bacteria, amphibians, etc.) from expressed in cells. Iron uptake by these cells is measured using radioactive isotopes, for example. In addition, you can also measure binding of iron to hepcidin gene product. Such experiments, iron uptake, binding, and by cells to help assess the role of hepcidin gene and hepcidin gene products in cells or in transit.

[0071] In one embodiment of the present invention is a therapeutic treatment, diagnostic methods and kits by hepcidin, hepcidin overexpressing, for example, such as genetic engineering or to downregulate approach can be used. In certain therapeutic applications of genes, hepcidin, hepcidin gene mutations, protein hepcidin protein is desirable to down-regulate the function and / or protein expression or mutant protein hepcidin. For example, certain types of anemia, eg, iron (ie, thalassemia, hemolytic anemia, transfusion), and with less accumulation in the body, it is desirable protein hepcidin downregulation of hepcidin gene or protein normally expected. On the other hand, in a state that has accumulated in excess of iron in the body is preferably down-regulation of hepcidin gene mutations or protein-protein hepcidin.

[0072] As described above, specific antibodies can be prepared in the normal or mutant protein-protein hepcidin. Such antibodies can be used therapeutically

in the diseases described herein. For example, if you bring an excess accumulation of iron in the body to upregulate hepcidin ventricular function is normal proteins associated with mutant proteins, which can be used to block the action of hepcidin gene mutations or normal. Similarly, the antibody can be used therapeutically to block the action of protein-protein hepcidin causes iron to accumulate in the body too small.

[0073] in a similar manner, hepcidin gene is either normal or mutant form, the use of antisense oligonucleotides directed against the gene or transcript can be downregulated through. Similar strategies can be used in connection with an antibody as discussed above. Particularly valuable for the introduction and use of discussion about the design of an antisense oligonucleotide, Uhlmann et al which is incorporated by reference the disclosure. (1990), see Chemical Reviews 90:543-584. The antisense oligonucleotide of the present invention can be synthesized by chemical oligonucleotide synthesis methods known either. Such methods are generally, Winnacker Chirurg for example (1992), which is described in 63:145. Antisense oligonucleotides are most advantageously be prepared using any automated nucleic acid synthesis equipment commercially available. Type 380B DNA synthesizer manufactured by Applied Biosystems is one such device, beta -use of the chemical nature of cyanoethyl phosphoramidite.

[0074] complete nucleotide synthesis of DNA is complementary to a hepcidin gene is not known, also known mRNA transcript of the sequence cDNA. Thus, an antisense oligonucleotide capable of hybridizing with any part of such a transcript

may be prepared by oligonucleotide synthesis methods known in the art. In the practice of the invention can be utilized oligonucleotides of the length of one sequence is shorter than 12 bases have low specificity when hybridized to the target mRNA is destroyed more easily by enzymatic digestion, by enzymatic digestion and may be destabilized. Thus, preferred oligonucleotides have at least 12 nucleotides. Long sequences, sequences greater than about 40 nucleotides, especially due to reduced uptake by target cells may be somewhat less effective in inhibiting translation. Thus, preferably 12 to 40 nucleotides, more preferably 15 to 30 nucleotides, most preferably oligomers of 18-26 nucleotides. The most particularly preferred is an array of 18 to 24 nucleotides.

[0075] In yet another aspect of the invention, hepcidin, hepcidin, by treating the patient as well as for agonists or antagonists of hepcidin, described herein available for the treatment of disease. Iron uptake in cells, by varying the concentration of hepcidin can be regulated by inhibiting hepcidin binding to iron or transferrin receptor and / or. Accordingly, hepcidin, and hepcidin agonists or antagonists may be useful in treating disorders of the presence of iron metabolism. For example, such materials are hemochromatosis, neurodegenerative diseases, damaged ischemic tissue, including the trauma or ischemic stroke, heart disease, and tumors, skin cancer, especially of such other diseases described herein and may be useful in the treatment of the condition.

[0076] The present invention, which encompasses a method of modulating iron metabolism

using a further hepcidin. In particular, the invention provides a method for treating a disorder of iron metabolism comprising state, modulating amount of hepcidin iron, hepcidin, or stimulants, including the step of administering a method for agonists or antagonists. State, including the failure of iron metabolism can be treated using the methods of the present invention, for example, hemochromatosis, neurodegenerative disease, tissue damage of ischemic including trauma or ischemic stroke, heart disease, and tumors, Other diseases included herein and in particular skin cancer. Agonist or antagonist of hepcidin substance, the substance of hepcidin and iron, and the effect of binding activity and transferrin receptor TfR1 hepcidin or TfR2 or hepcidin expression of hepcidin in cells capable of expressing the substance or its can be identified by determining the effect of, and these cells, including cells that are produced by genetically modified to express a hepcidin on their surface.

[0077] For this invention, in one aspect, and about how to identify an agonist or antagonist of hepcidin, which, under conditions of hepcidin can bind to the iron-hepcidin and the step of reacting and hepcidin and the iron is suspected agonist or antagonist, a step of measuring the amount of hepcidin bound to iron, compared with the amount determined for controlling the amount of hepcidin and the iron-bound including determining the effect of the material by. The present invention is a method of identifying an agonist or antagonist with respect to the hepcidin Furthermore, this method, hepcidin, and transferrin receptor and is suspected of hepcidin agonist or antagonist under conditions that hepcidin can bind to the transferrin receptor step of the reaction of the body, a step of

measuring the amount of hepcidin bound to the transferrin receptor, to determine the effects of the substance by comparing the amount determined for controlling the amount of hepcidin bound to transferrin receptor and a step.

[0078] The present invention further has information on how to identify an agonist or antagonist of hepcidin, this method, a substance suspected of hepcidin agonist or antagonist of hepcidin step of the reaction of the cells that produce a step of measuring the amount of hepcidin was expressed by a cell, comprising the steps of determining the effects of the substance by comparing the amount determined for controlling the expression level of hepcidin. The invention further has information on how to identify agonist or antagonist of hepcidin-mediated iron uptake, this method is an agonist of hepcidin or hepcidin to cells expressing on its surface in the absence of the presence of iron and transferrin and incubating the substance suspected to be an antagonist, a step of measuring the amount of iron uptake into cells, cells from the control incubation in the absence of the substance and the amount of iron uptake and intracellular and a step of identifying agonists or antagonists of hepcidin-mediated iron uptake by comparing the iron uptake.

[0079] In some embodiments of the invention, the primary iron overload disease or syndrome, such as hemochromatosis, caused by secondary causes, such as eg blood transfusion or repeat peptide hepcidin is provided for use in treating patients with symptoms of other conditions of iron overload. Peptide hepcidin may be a fragment of some length hepcidin or hepcidin. Preferably, a hepcidin

peptide comprises amino acid residues 47-28 or 80-70 of hepcidin. Genomic and cDNA sequences and predicted amino acid sequence of hepcidin, which is incorporated by reference in their entirety by this (Krause et al., (2000) FEBS Lett.480,147-150; Pigeon et al., (2001) J.Biol.Chem.276,7811-7819) was provided. Protein fragments that can lay hepcidin protein, beta, for example in the shape of the complex may be administered-2-microglobulin with the. In some embodiments, hepcidin protein quality is greater than about 20 amino acids are administered in the beta -2-microglobulin and complex.

[0080] In some embodiments of the present invention, there is provided a transferrin receptor agonist or antagonist of hepcidin protein or proteins. Hepcidin agonist polypeptide, transferrin receptor antagonists and / or are useful in the treatment of iron overload disease or syndrome may, for example primary or secondary, hepcidin antagonists of other polypeptides, or agonists of the transferrin receptor useful in the treatment of conditions such as iron-deficiency anemia, for example. In another embodiment, is provided / mutant protein peptide hepcidin protein that acts as an antagonist of wild-type protein-protein hepcidin. Agonists or antagonists, transferrin receptor, the central part of the hepcidin protein or proteins (amino acids 20 and 50) or C-terminal region (amino acids 65 to 84) may be an antibody directed against. In some embodiments of the invention, hepcidin polypeptides can act as a transferrin receptor antagonists. In yet another embodiment of the present invention, the peptidomimetic can be designed as a transferrin receptor antagonists or

agonists and / or protein-protein hepcidin using techniques well known in the art.

[0081] ligand for the transferrin receptor, the antagonist, even even agonist, using the techniques described herein for the ability to bind to the transferrin receptor and can be screened. In addition, competition for binding to the transferrin receptor hepcidin can be performed using techniques well known in the art. Ligand, or, more generally, binding partners for a hepcidin protein quality, using the techniques described herein, for example, beta polypeptide of hepcidin-2-complexed ability to inhibit microglobulin can be screened for.

[0082] In some embodiments of the invention, agonists or antagonists of transferrin, as well as, iron is transported into the cells such as lymphocytes or hepatocytes of patients be used to increase or decrease the volume. For example, drug therapies, the effectiveness of an agonist or antagonist can be identified in screening programs to be monitored in vitro cell lines that regulatory. Host cell expressing a / peptide hepcidin protein mutant proteins in various fit for use as a primary screening system. Candidates, by measuring the hepcidin gene and cell functions that depend on the incubation of these cells can be evaluated by measuring the protein folding or processing, or proper hepcidin protein. Such assays, receptor-like activity, such as studies of gene function is determined by further hepcidin, iron transport and metabolism, it also requires a step of measuring the biological function of gene transcription or other upstream or downstream there.

[0083] Alternatively, you can also use cell-free

system. Purified protein hepcidin protein can be reconstituted in artificial membranes or vesicles and drugs are screened in cell-free system. Such systems are often more conveniently, in essence a more manageable and automated screening for high-throughput type.

[0084] criteria for determining the purity of the protein hepcidin protein, contains a standard reference for the field of protein science. These include law-terminal amino acid determines N, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and one-dimensional, and that includes silver staining. Studies on the determination of the purified protein secondary and tertiary structure to be useful in drug design, useful for use in in vitro studies on the molecular and biological functions.

[0085] In some embodiments of the invention, for modulating the activity of hepcidin protein hepcidin gene and protein functions from protein interactions are known hepcidin protein structure knowledge and drugs can be designed. Therefore, the examination-ray crystallography X, computer-aided molecular modeling (CAMM), quantitative or qualitative structure - activity relationship (QSAR), by using rational drug design and similar engineering is more focused on drug discovery efforts can be combined. Rational design, which allows the prediction of protein structure can be modified or synthetic hepcidin protein activity and the activity of protein-protein interactions and protein hepcidin. Such structures can be synthesized chemically, can be expressed in a tissue or biological. This approach, Capsey et al., Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs, Stockton Press, New York (1988) are

considered in. Furthermore, the combinatorial library design and synthesis, which can be used in screening programs.

[0086] according to the invention for administering a therapeutic agent or derived therefrom, improved transportation, delivery, suitable carriers to provide such immunity, the vehicle agents can incorporate other materials in preparation and will be appreciated.

[0087] in the formulary known to all pharmaceutical professionals can find a very large number of preparations. Remington's Pharmaceutical Sciences, (15th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)), Blaug in it, particularly Chapter 87 by Seymour. In these preparations, for example, powders, pastes, ointments, jellies, waxes, oils, fats, base absorbent anhydrous emulsion water in oil or oil-in water, carbon wax emulsion (polyethylene glycol of molecular weight variety) semi-solid gel, which contains a mixture of liquid and semi-containing carbowax.

[0088] The above formulation is not inactivated by the formulation of the active substance in the preparation, the conditions that are physiologically compatible and its preparation, may be appropriate in treatments and therapies of the invention.

[0089] The present invention, the embodiments described herein are not limited and can be changed or modified without departing from the scope of the invention.

[0090] Human liver samples used in this study the expression of hepcidin in human liver tissue and tissue specimens (n ??= 7), the partial liver in adult subjects with liver

metastases obtained after resection. Healthy tissue, either fixed in 4 percent paraformaldehyde for immunohistochemistry, RT or-PCR, frozen in liquid nitrogen for Western blot and immunofluorescence analysis.

[0091] guinea pigs (n = 7) and mice (n = 5) were anesthetized, and were subsequently sacrificed by cervical dislocation. Liver tissue samples were excised from the heart and skeletal muscle, or frozen in liquid nitrogen for Western blot analysis or fixed in paraformaldehyde.

[0092] Peptide synthesis, immunization protocol, and antibody arrays
Purohepushijin published (Krause et al., (2000) FEBS Lett.480,147-150; Pigeon et al., (2001) J.Biol.Chem.276,7811-7819) from the hepcidin peptide - (28-47) and hepcidin - (70-84) a, Fmoc standard protocol (Cetin et al., (1994), Proc. Natl.Acad.Sci.USA 91,2935-2939) was synthesized using a C-terminal amide. These peptides of m-maleimidobenzoyl-N-is bound to the blue guy hemocyanin using the hydroxysuccinimide ester, SPF rabbits and two (Charles River Iffa Credo) peptide conjugates each (by Eurogentec, Seraing, Belgium country) were immunized by. In this study, after testing the titer by ELISA, hepcidin - (70-84) directed against the [EG (1)-HepC] and hepcidin each - (28-47) EG directed against (1)-EG and HepN (2)-using three antisera of HepN (1 figure). (Hepcidin 28-47: PQQ TGQ LAE LQP QDR AGA RA (3 SEQ), hepcidin 70-84: CGC CHR SKC GMC CKT (4 SEQ)). Peptide epitopes used to generate the antiserum did not show any homology to the protein was also reported to have been confirmed so far by searching BLAST P2.

[0093] or mouse TfR2 ('s BioTrend, Cologne, Germany) BT TFR21S antibody against-the-human TfR2 example shows 68 percent sequence homology to the corresponding region of a mouse TfR2 a and beta isoforms were spliced ??into the-a (TfR2) were produced against the N-terminal cytoplasmic mouse. For example, Fleming et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,2214-2219) see. This antibody generated in rabbits, affinity purified.

[0094] expression analysis in human liver RNA isolation was performed using the Qiagen RNeasy kit, including the digestion DNA. Reverse transcription (RT)-PCR analysis, as described previously (Kulaksiz et al., (2002) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99,6796-6801; Kulaksiz et al., (2002) Am. J.Pathol.161,655-664), 5-Hitohpushijin following primers and specifications are presented in orientation 3 '(NM0211175 database GenBank accession number), corresponding to the 5'147-165 and 338-316 nucleotide position- CTG CAA CCC CAG GAC AGAG-3 '(5 SEQ), and 5, GGA ATA AAT AAG GAA GGG AGG GG-3' (6 SEQ) were conducted using the. Human TfR2 and 2694-2675 corresponding to nucleotide positions 2496-2515 (# AF067864), 5'-GAT TCA GGG TCA GGG AGG TG-3 '(7 SEQ) and 5'-(GAA GGG GCT GTG ATT GAA GG- 3 '(SEQ ID NO 8). 94 ?, after initial denaturation for 4 minutes; The reaction mixture was Saseta under heating program for the next 35 cycles. 30 seconds at 94 ?, 30 seconds at 60 ?, 72 ? and for 30 seconds; this program continued after the chain extension step at 72 ? for 5 minutes at the end. amplified product, / 2mM EDTA 89mM Tris/89mM boric acid, ethidium bromide stained 1.8 percent (pH 8.3) were run on agarose gels. significant levels of amplification of genomic

DNA was excluded by appropriate controls.

[0095] German Collection of Microorganisms and Cell Culture Human hepatoma HepG2 cells were analyzed in cells expressing HEPG2 (Braunschweig, Germany) was obtained from, 10 percent (v / v) FBS heat inactivated, penicillin (/ mL per 100), and streptomycin (100mg/mL) RPMI 1640 medium supplemented with (by Gibco, Karlsruhe, Germany) 5 percent CO₂ in were grown at 37 ° in. Cells, RT primer using the above-analyzed by the PCR. Were grown on glass slides were fixed in methanol over 4 minutes HepG2 cells for immunofluorescence microscopy assays, 0.5 percent Triton X in PBS-treated and 100 for transmission. Hepcidin (1:2000) and TFR2 antibody (1:1000) over a 60-minute incubation, Cy-3-and subsequent-conjugated anti-rabbit antibody (by Dianova, Hamburg, Germany) after incubation together with appropriate filters immunostaining was investigated under a microscope using Olympus AX70.

[0096] Serum hepcidin extracted larger as the origin of hepcidin and TFR2 HEPG2 tissues and cells, the present Applicants have collected sera from patients with chronic renal failure. To extract the hepcidin, serum samples diluted 1:1 20mL using 0.01N HCl, was adjusted to pH 3.0 using concentrated HCl. 0.5M acetic acid mixed in frozen tissue and HepG2 cells, (Cetin et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91,2935-2939; Cetin et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92,5925 - 5929) and boiled for eight minutes as listed. Ultra-Turrax homogenizer (Janke and Kunkel, Hohenstaufen, Germany) was homogenized using a sample was centrifuged at 20,000 x g over 20 minutes at 4 °, filtered through a 0.45

micro m pore diameter of the supernatant and filtered. In order to concentrate the protein, the serum samples, whole tissue extract octadecadienoic cells and silyl (C18) Sep-Pak cartridge (by Waters, MA) was applied to. The column was washed with 0.01M HCl, 30 percent (v / v) 2 for - propanol / 30 percent (v / v) eluted with methanol / 0.01M HCl in (Cetin et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91,2935-2939). Freeze-dried protein fractions were stored at - 80 ° until use. For analysis of TfR2, tissues and cells are 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 percent glycerol, 1 percent Triton X-100, leupeptin for 2mg/mL, pepstatin of 2mg/mL, and 1mM of Tris containing phenylmethylsulfonyl fluoride-HCl will be homogenized in buffer and centrifuged at 100,000 g for 30 min and at 4 °.

[0097] Western blot analysis for immunoblot analysis, protein extracts was 4 percent (w / v) SDS (by Merck, Darmstadt, Germany), 50mM Tris-HCl (pH 8.15), 1mM EDTA, 3.24mM dithiothreitol (by Roth, Karlsruhe, Germany), 12.5 percent ??(w / v) glycerol (by Merck), 0.002 percent, and bromophenol blue (Merck) incubated at 94 ° for 7 minutes in a sample buffer containing. To detect hepcidin, 16.5 percent Tricine-SDS-polyacrylamide gel protocols published (Cetin et al., (1994), Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91,2935-2939; Kulaksiz et al., (2002) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99,6796-6801; Kulaksiz et al., (2002) Am.J.Pathol.161, 655 - 664; Cetin et al., (1995) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 92,5925-5929) was used by. TfR2 immunoblotting was, 8 percent SDS-polyacrylamide was carried out using the gel. After electrophoresis, the base layer and a hydrophobic polyvinylidene fluoride by semi-dry blotting (by Pall, Portsmouth, UK) were transferred onto

proteins. These membranes were incubated overnight with hepcidin or TfR2 antibodies at dilutions as described above. 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, Tris and containing 0.05 percent Tween 20-washed in buffered saline, and 5-nitro blue tetrazolium as chromogens - bromo -4 - chloro-3 - indolyl phosphate (Sigma) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit antibody using (1:50,000 dilution; by Sigma) to visualize the immunoreactive protein after incubation with each imposed. Immunoreactivity on Western blot, which specifically blocked after preincubation of the antibody and the corresponding peptide immunogens. Cross-reactivity of antibodies and goat anti-rabbit 2 was eliminated by appropriate controls (Cetin et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91,2935-2939; Kulaksiz et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99,6796-6801; Kulaksiz et al. (2002) Am J Pathol 161,655-664; Cetin et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92,5925 - 5929).

[0098] was fixed at 4 ° for 18 hours in 4 percent paraformaldehyde for tissue immunohistochemistry and immunofluorescence. After dehydration in ethanol in a stepwise dilution, specimens were embedded in paraffin. Paraffin sections (5 micro m) to hepcidin (EG antibody (I)-HepN, EG (2)-HepN, EG, and (I)-HepC, 1:2000 dilution each) TfR2 or (BT antibody-TFR21-S. Dilutions 1:1000) for, as previously described avidin - biotin - peroxidase complex (ABC) method and the order of incubation (Kulaksiz et al., (2002) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99,6796 - 6801; Kulaksiz et al., (2002) Am.J.Pathol.161,655-664) by immunostaining. These sections were incubated for 24 hours at 4 ° with the respective antibody, biotinylated anti-rabbit IgG and then 1:200 dilution (by Jackson Immunoresearch,

West Grove, Pennsylvania, USA) and incubated for 30 minutes along. These sections were formed prior to biotin diluted in PBS and then - peroxidase / streptavidin (by Jackson Immunoresearch) for 30 min with the complexes (final concentrations: biotin - peroxidase, 0.7 micro g/mL; streptavidin, 5 micro g/mL). Antigen - antibody binding site, 0.05M Tris-HCl (pH 7.6)-diaminobenzidine / 0.002 percent H_2O_2 in 0.07M HCl. The sections were visualized by incubation with.

[0099] For immunofluorescence microscopy, tissue sections from human liver (2 ~ 4 micro m) is a cryo-microtome (FrigoCut 2800E; by Leica, Nussloch, Germany) prepared using The air-dried over two hours, and cold acetone (-20 °C) were fixed for 10 minutes over. Double immunofluorescence labeling, the specific hepcidin antibodies (1:1000 dilution) P tubule-glycoprotein and the 1:30 dilution (by Centocor, Malvern, Pa.) C219 monoclonal antibodies produced against (id.) was performed as previously described using (Rost et al., (1999) Hepatology 29,814-821). After incubation with each antiserum, mouse and rabbit IgG (by Dianova, Hamburg, Germany) Cy2 for-(1:200) Cy3-and (1:600) staining was performed by incubation with labeled antibody. Photomicrographs, digital cameras (color view 12, by soft imaging system SIS, Muenster, Germany) and Analysis software (company SIS, Munster, Germany) were taken using Olympus AX70 microscope equipped with.

[0100]-dependent nonspecific control method specificity, (Cetin et al., (1994), Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91,2935-2939; Cetin et al., (1995)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92,5925-5929) was eliminated by the control run, as listed. Antibody specificity was tested by prior adsorption of homologous and heterologous antibody and the antigen peptide (antiserum 6.25 ~ 100 micro g/mL) (Kulaksiz et al., (2002) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99,6796-6801; Kulaksiz et al., (2002) Am.J.Pathol.161,655-664). Before adsorption with cognate antigen and antibody at concentrations as low as 6.25 micro g/mL is completely blocked immunostaining in liver tissue and cells, and before adsorption of the foreign antigen and antibody concentrations of up to 100 micro g/mL did not affect immunostaining.

[0101] Hcpidin ELISA competitive binding assay is a serum sample, and 26 healthy individuals (n = 13 females, 13 males, age 26-64 years, mean 43 years), and phlebotomy patients (15 cases) and those not receiving (eg 20) comprising 35 patients homozygous for the mutation C282Y HH zygosity in HFE including (for example, 14 women, 21 men, age 23-82 years, mean 54 years), 59 cases of renal failure patients undergoing hemodialysis and long-term (33 cases female, age 26 male, age 26-96 years, mean 57 years) were obtained from. During sample collection, the attention paid to patients to prevent infection. Group of 19 patients with renal insufficiency, renal anemia had a hemoglobin and a maximum 11g/dl. All patients with chronic renal failure disease, recombinant human erythropoietin 3,000 IE (EPO) were treated using two to three times a week. 10mL blood samples were collected in ice-cold serum tubes for 10 minutes at 4 °, centrifuged at 2,500 x g. Measurement, 40mM Tris-HCl (pH 7.3), Tris-buffered saline solution containing 100mM NaCl (TBS) EG rabbit anti-hepcidin antibody

diluted 1:4000 in 2-coated HepN (200 micro L / well) were performed twice using a 96-well microtiter plates. Various amounts of synthetic peptides (0,20,100,500, 1,000 ng / mL) and 50 micro L and samples containing human serum reference material or terminally biotinylated hepcidin N - (28-47) (Peptide by Specialty Laboratories, Heidelberg, Germany) was added to each well and 150 micro L (2ng / well) and incubated for 1 hour at room temperature. TBST (TBS including 0.05 percent Tween 20) was washed, using a biotinylated antigen - antibody complexes, the substrate tetramethylbenzidine (by DRG Instruments, Marburg, Germany) using streptavidin - peroxidase enzyme (by Dako, Hamburg, Germany) was detected by. Color reaction is 1M H₂ SO₄ is stopped, using the absorbance read at a wavelength 450/630nm solution.

[0102] EXCEL spreadsheet by typing in the value of hepcidin was measured in four groups in question were evaluated using SAS WIN Version 8.2. Measurements, the following summary statistics for each diagnostic group: The number of observations, arithmetic mean, standard deviation, minimum, median, and summarized by the maximum. Possible differences between groups were analyzed using a pairwise test Wilcoxon U. 5 percent significance level (0.05) is selected. Purohepushijin and iron, ferritin or transferrin correlates with the rank correlation was analyzed by Spearman.

[0103] RT TFR2 expression of hepcidin in cells, and liver and HEPG2-PCR analysis, demonstrated that hepcidin is expressed in human liver (Gehrke et al. (2003) Blood MS # 2002-11-3610.R2).,192-HepG2 cells

is similar to the predicted PCR product bp (control) were detected in these has been already demonstrated to express hepcidin (Pigeon C et al. (2001) J Biol Chem 276,7811-7819; Gehrke et al. (2003) (2A figure). In addition, RT-PCR analysis was clearly understood to be expressed in human liver and HepG2 cell TfR2 (data not shown).

[0104] Western blot analysis, total hepcidin antibodies [EG (I)-HepN, EG (2)-HepN, EG, and (1)-HepC] is a human and a match identified a band of ~ 10kDa immunoreactivity in guinea pig liver extracts. Liver peptide is moved along with the band recognized by the antibody immunoreactive hepcidin in cell homogenates HepG2 (2B ~ D figure). All antibodies identified a ~ 20kDa immunoreactive protein in all lanes were loaded with cell extracts of human and guinea pig liver extracts or HepG2 further. Skeletal muscle extracts (control) of Western blot analysis showed bands of immunoreactive bands of 20kDa 10kDa (2B ~ D figure). BT antibody Western blot analysis of TfR2-TFR21-S, was expected in extracts of mouse liver (Fleming et al., (2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97,2214-2219) ~ 105kDa protein gave rise to staining. In extracts of human liver and HepG2 cells were recognized by the same antibody immunoreactive protein in the extent of ~ 105kDa immunoreactive TfR2 and ~ 95kDa (data not shown). Heart (control tissue) in the immunoreactivity was not detected.

[0105] by using the epitope-specific anti-hepcidin antibody immunofluorescence in cells HEPG2, was examined by immunofluorescence analysis of peptide hepcidin expression in cells HepG2. All antibodies similarly identified the hepcidin in

HepG2 cells gave rise to a strong immunoreactivity (Figure 3). Match the cellular localization of hepcidin, the Tfr2 antibody detected Tfr2 is in the same cells (data not shown).

[0106]

immunohistochemical tests using antibodies specific for various regions and subcellular localization and cellular localization of hepcidin consistent TFR2, human liver liver hepcidin localized to the cells (Figure 4). Kupffer cells, endothelial cells, bile duct, and vascular systems hepcidin immunoreactivity was completely lacking. The same antibody, immunoreactivity was detected in liver hepcidin strength guinea pig (Fig. 4). Hepatic lobules were heterogeneous with respect to hepcidin immunoreactivity. In the liver lobule, hepcidin immunoreactive cells are located in a predominantly periportal, the frequency of hepcidin-positive cells continuously decreased towards the central vein from the portal triad (Figure 5). Also notably, between hepcidin positive cells there were clear differences between the cells. The vast majority of hepatocytes were positive for hepcidin strength, other liver cells showed only faint staining only, was completely non-reactive or to hepcidin (Figure 5). Intracellular level, hepcidin immunoreactivity by immunohistochemistry in liver basolateral (sinusoidal =>) was restricted to membrane domains. Each cell in the apical membrane domain immunoreactivity was found (Figure 2). Similarly, immunofluorescence analysis demonstrated a strong immunoreactivity for hepcidin at the basolateral membrane domain; P-apical tubules as revealed by double staining using antibodies produced against the glycoprotein C219 immunoreactivity was observed from the

membrane domain (Rost et al. (1999) Hepatology 29,814-821) (data not shown).

[0107] corresponds to the localization of hepcidin, BT-TFR21-S protein-specific antibodies were detected Tfr2 in human and mouse liver. At the cellular level, Tfr2 has been found in the basolateral membrane of hepatocytes, which revealed a clear difference between cells on the strength of immunoreactivity (data not shown). Heterogeneity is also observed in the liver lobule, immunoreactivity increased towards the central vein portal triad.

[0108] EG N-terminal hepcidin antibody specific for the detection of hepcidin propeptide in human plasma (2)-using HepN, Purohepushijin sensitivity ELISA provided stability and reproducibility Assay (by DRG Instruments, Marburg, Germany) was developed. As is apparent from Figure 6, ELISA showed the highest resolution in the range between 4 and 400ng/mL concentration is determined in human serum Purohepushijin. As specificity control, incubation in ELISA was performed using a heterologous peptide. When using different peptides, cross-reactivity was observed.

[0109] Purohepushijin presence of blood was confirmed by Western blot analysis. All hepcidin antibodies identified a single hepcidin immunoreactive band of ~ 10kDa molecular weight was moved along exactly with the immunoreactive hepcidin in liver tissues and HepG2 cell extracts in human serum extracts (Fig. 2, B ~ D).

[0110] sensitivity of the ELISA assay was characteristic 3.95ng/mL. The lowest standard material (20ng/mL) and showed no overlap. Serial dilutions of human pro-hepcidin was

dissolved material was run in parallel with the zero standard curve of ELISA in Purohepushijin recoveries in the range of 90.6 to 111.6 percent. The recovery was expressed as a percentage of the observed concentration was 105.7 percent from 91.8 percent forecast. Good accuracy was demonstrated in three concentrations were tested across a range of Purohepushijin assay (CV total <10 percent).

[0111] hereditary hemochromatosis, hepcidin ELISA using a highly sensitive pro-hepcidin levels in patients with chronic renal failure and renal anemia, 51.6 ~ 153.4ng / mL (serum) (plus or minus SE mean values; 106.2 plus or minus 32.1ng/mL) was detected in 26 patients in the control group of healthy volunteers within the Purohepushijin (Fig. 7, Table 1). In HH patients, the concentration of 153.9ng/mL Purohepushijin is from 12.1 (serum) (plus or minus SE mean values; 70.2 plus or minus 38.1ng/mL), respectively. These concentrations were significantly lower compared with the concentration of control subjects ($P < 0.05$) (7 figure, Table 1). Purohepushijin concentration in the serum of patients suffering from CRI is 471.3ng/mL 31.1 (plus or minus SE mean values; 1481 plus or minus 88.0ng/mL) to vary, control subjects ($P < 0.01$) and HH ($P < 0.001$) was significantly increased compared with concentration in. This is in contrast, pro-hepcidin levels in hemodialysis patients having RA (115.0 plus or minus 53.1ng/mL; range, 20.5 ~ 252.4ng/mL) ($P = 0.05$) is was significantly reduced compared with patients with CRI (7 figure, Table 1).

[0112] Purohepushijin and iron, ferritin or transferrin saturation between samples from the present applicant (HH, CRI, and serum from RA) has found significant

correlation in did not (Fig. 8). Difference test showed no significance from zero.

[0113]

[0114] RT using specific primer-PCR analysis study, hepcidin is, clearly differentiated hepatocellular carcinoma cells shows a normal liver cell physiology in many aspects HepG2 cells that the system (control) proved to be highly expressed in (Aden et al. (1979) Nature 282,615-616). Using the appropriate primer specifications and combinations used in the successful conclusion in the cells HepG2, RT-PCR testing has confirmed the expression of hepcidin in human liver. Antibodies to different kinds of three epitopes variety of precursor molecule hepcidin (Figure 1), by Western blot analysis, not only in cells HepG2, even in extracts of liver and guinea pigs who are the two species, immunoreactive peptides were identified in ~ 10kDa. Apparent molecular weight of this immunoreactive peptide, which were estimated according to the predicted molecular weight for the hepcidin prohormone from the sequence cDNA (Pigeon C et al. (2001) J Biol Chem 276,7811-7819) (1 figure.) Interestingly, a second immunoreactive band of ~ 20kDa, which was detected by full-hepcidin antibodies in extracts of human and guinea pig liver cells and HepG2, in the organization lacked control. This immunoreactive protein, hepcidin could reflect the type of dimer. In fact, previous studies, for hepcidin -25 formation of multimers that may be characteristics and aggregation for hepcidin -20 has been described has not been described (Hunter et al. (2002) J Biol Chem 277,37597 -37 603).

[0115]

Immunocytochemical studies using antibodies specific for

hepcidin and region-specific molecular domains, as has already been demonstrated by molecular biology techniques, in these cells revealed the strong immunoreactivity in HepG2 cells showing the expression of hepcidin (Gehrke et al. (2003) Blood MS # 2002-11-3610.R2).

Immunohistochemical and immunofluorescence using these different hepcidin antibodies, in human and guinea pig liver, to be located specifically in liver cells, located mainly around the portal triad is particularly hepcidin indicated. Specific antibody staining was consistent with the various regions not only in HepG2 cells in human and guinea pig liver, which points out that the origin of hepatocytes hepcidin. Hepcidin immunoreactivity decreased from the central vein towards the periportal zone. Band in this portal lobules, because they have access to the portal vein first pass to transport iron rich blood from the gut periportal hepatocytes, may have functional significance. Also notably, between hepcidin positive cells with respect to the density of hepcidin immunoreactivity that may reflect the differences between the expression or secretion of hepcidin in cells there were clear differences between the cells.

[0116] at the intracellular level, hepcidin was concentrated in the basolateral membrane domain of hepatocytes. Apical membrane domain, the immunoreactivity was found. The distribution pattern of discrete levels of hepcidin in cells can be directed to infer that the basolateral release of hepcidin into the liver sinusoidal vessel. This directional secretory pathway of hepcidin prohormone detected in human serum (Fig. 1) was demonstrated by adding some (see below). As a result, these findings have provided further evidence

that iron can regulate metabolism through the secretion of endocrine Purohepushijin law.

[0117] to analyze the expression and cellular distribution of each target membrane domain and TfR2, RT at the cellular level-PCR, was performed Western blot and immunohistochemical studies. As demonstrated in previous studies, RT-PCR analysis revealed the liver to be highly expressed in human TfR2. (Fleming et al., (2000)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97,2214-2219). The presence of this protein, BT specific for human and mouse TfR2-TFR21-test was confirmed by Western blot using antibodies S. Immunoreactive protein of ~ 105kDa was detected in mouse liver extracts. The molecular weight of 95kDa immunoreactive TfR2 was expected (Fleming et al., (2000)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97,2214-2219) slightly larger than, as previously described (Kawabata et al., (2000)

J.Biol.Chem.275,16618-16625) may represent some posttranslational modifications. But under the same conditions, TfR2-antibody in extracts of human liver protein and predicted molecular weight 95kDa 105kDa protein was identified comprising a lower affinity. Discrepancy between human and mouse liver immunoblot is considered to be due to differences between species.

[0118] Immunohistochemical examination was understood to be localized in liver hepatocytes of human and mouse TfR2. Match the cellular distribution of hepcidin, protein-specific antibodies were localized in the basolateral membrane exclusively TfR2. Specifically related to this type of membrane TfR2, especially related to iron metabolism by

mediating the uptake of transferrin-bound iron from blood into liver cells by binding to transferrin iron, TfR2 activation of basolateral tell that (Philpott, C.C. (2002) Hepatology 35,993-1001; Subramaniam et al., (2002) Cell Biochem.Biophys.36,235-239). Notably, the band was observed for TfR2 leaflet similar to those described for hepcidin immunoreactivity was reduced towards the central vein from the periportal zone.

[0119] because it has been discussed in previous studies of the interaction between hepcidin and TfR2 at the cellular level (Nicolas et al., (2001) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 98,8780-8785; Frazer et al., (2002) Gastroenterology 123,835-844), cells HepG2 - cell lines clearly differentiated hepatocellular carcinoma (Aden et al., (1979) Nature 282,615 - 616) are analyzed with the coexistence of hepcidin and TfR2, has been demonstrated in physiological properties of normal liver cells in many aspects. RT primer and use the proper combination has been used successfully in human liver-PCR test was identified expression of hepcidin and TfR2 in cell HepG2. At the translational level, the presence of hepcidin and TfR2 in HepG2 cells was confirmed by Western blot test produced a protein immunoreactive bands move the precise molecular weight immunoreactive band together with the corresponding liver tissue. Co-localization of each protein in HepG2 cells has been demonstrated in particular by immunocytochemistry using an antibody specific for the corresponding region-specific domains and molecular. Whole antibody is has proved labeling hepcidin in cells HepG2, to elucidate the pattern of immunoreactive granules in these cells, which to a

secretory vesicle little has already been demonstrated in liver cells by electron microscopy to infer the localization of the peptides (Schwartz et al., (1985) EMBO J.4,899-904). TfR2, along with a unique distribution pattern, localized immunocytochemically to cells HepG2.

[0120] and based on data from this study at the level of transcription and translation levels, TfR2, and hepcidin is expressed in both liver and colocalization in the basolateral domain of hepatocytes be. In addition to the localization of TfR2 and hepcidin matching at the cellular level, similar to the distribution of these molecules in the hepatic lobules with decreasing towards the central vein stained and immunoreactivity was concentrated in the periportal zone also detected. Common (basolateral) expression coordination of these proteins in the band lobules similar and their membrane domains are in favor of functional binding form of incorporation and transferrin-bound iron via the TfR2 and the peptide hormone hepcidin regulatory The. In fact, have demonstrated the interaction between hepcidin and the various data TfR2. First, the changes in transferrin saturation is probably sensed by TfR2 regulates hepatic expression of hepcidin (Philpott, C.C. (2002) Hepatology 35,993-1001). Second, RT-quantitative on the human liver, as is clear from the analysis of PCR, hepatic expression of TfR2 is significantly associated with hepcidin expression is regulated by transferrin saturation (S. G. Gehrke, H. Kulaksiz et al., unpublished data). Third, TfR2 and hepcidin has been colocalized to the same membrane domain, mutations in cases of TfR2 (Fleming et al., (2002) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99,10653-10658) and

hepcidin (Nicolas et al., (2001) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98,8780-8785) with a similar distribution of lobular strong immunoreactivity in periportal zones, the site you want to disable the expression of have been revealed, hepcidin (Zhou et al., (1998) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95,2492-2497; Levy et al., (1999) Blood 94,9-11) B2m and (Santos et al., (1996) J.Exp.Med.184,1975-1985) also occur in hepatic iron overload. Fourth, mutations in the Tfr2 gene were reported to cause hemochromatosis (Camasehella et al., (2000) Nat.Genet.25,14-15). This may occur as a result of decreased expression of hepcidin in iron absorption in turn cause a rise in (Nicolas et al., (2001) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98,8780-8785).

[0121] common polar localization and lobular distribution in the liver and their simultaneous presence of hepcidin and Tfr2 in HepG2 cells, hepcidin is regulated by the transferrin saturation, and that indicate an endogenous peptide bound to the liver to form functional Tfr2 in order to modulate hepcidin expression. So, is expected to obtain relevant evidence from studies of hepcidin signaling pathways.

[0122] blood-forming tissue, and iron storage sites such as liver into the intestinal cells carry the signal that tells the body's requirements for dietary iron (Philpott C.C. (2002) Hepatology 35,993-1001), hepcidin is secreted from liver cells, is a candidate signaling factors that regulate intestinal iron absorption. Prior to the invention, however, the existence of certain molecular forms of hepcidin in the blood was controversial (Krause et al. (2000) FEBS Lett 489,147-150; Park et al. (2001) J Biol Chem 276,7806-7810;

Hunter et al. (002) J Biol Chem 277,37597-37603).

[0123] to analyze whether the prohormone of hepcidin is secreted into the blood, pro-hepcidin levels in human serum of patients with various diseases and healthy volunteers and In order to assess the scope of, EG produced antibodies against the N-terminal hepcidin prohormone (2)-ELISA was developed by applying HepN. Terminal antibody EG C (I)-HepC dot blot (data not shown), Western blot, immunohistochemistry, and immunofluorescence experiments (Figures 1-4) was revealed in a specific outcome, the ELISA to obtain the immunoreactivity was not. Tertiary structure and folding pattern of hepcidin is dense, EG (I)-may be the cause of the inability to identify circulating hepcidin antibodies HepC.

[0124] EG antibody (2)-ELISA using HepN is highly reproducible with a detection limit of 3.95ng / well, the stability and sensitivity as well as from four 400ng/mL was characterized by a strong resolution in the range. This range was determined ranged hepcidin concentrations. Healthy individuals (n = 26) in human serum-derived, is 153.4ng/mL Purohepushijin from 51.6 (plus or minus SE mean values; 106.2 plus or minus 32.1ng/mL) were measured in the range of This is comparable to the concentration of regulatory peptide hormones are known, about 11 times higher than the concentration of hepcidin in human urine (Park et al. (2001) J Biol Chem 276,7806-7810). Interestingly, the measured concentrations showed a wide range of Purohepushijin indicate that there is a strong possibility that this peptide regulated.

[0125] cDNA structures, the hepcidin, which suggests

that it is translated as a pre-84aa N-terminal propeptide that is processed into 20-25 amino acid peptide (Park et al. (2001) (Fig. 1 and 9)). Strong consensus sequence for a single cleavage site sequence Gly²⁴ propeptide residues would give rise to a 60 Ser²⁵ and is located between the previously Research has failed to isolate the larger propeptide from natural sources such as liver tissue and blood (Park et al. (2001)). In addition to technical difficulties, a wealthy propeptide converter phosphatase in the liver may inhibit the isolation of certain propeptides. In relation to this, recent studies, blood (Krause et al. (2000) FEBS Lett 489,147-150) and urine (Park et al. (2001) J Biol Chem 276,7806-7810) 2 in a while have proved to be composed of 20-25 amino acid C-terminus of this protein circulating form of hepcidin in humans has been described by two research groups. However, ELISA measurements of the present invention is carried out using specific antibodies produced against the N-terminal hepcidin precursor, which is in addition to the processed form of amino acids 20-25, hepcidin prohormone is secreted have shown that blood circulation in humans. In fact, was confirmed by Western blot analysis of potential liberation into the blood Purohepushijin. All hepcidin antibodies identified a single band of ~10kDa hepcidin moved along exactly with the immunoreactive hepcidin in tissue extracts of liver and HepG2 cells in extracts of human serum (positive control; 1.) 10kDa hepcidin was detected in smaller fragments. Purohepushijin presence of human serum, indicating that the secretion of the prohormone of hepcidin that may decrease dietary iron absorption via the endocrine pathway hepatocytes.

[0126] to analyze the

significance of hepcidin in patients with iron overload, the present invention has the typical characteristics of iron overload is detected in all HH patients tested to provide a concentration in the serum of 35 patients with hepcidin HH C282Y homozygous for a mutation in HFE. Hepcidin levels in these individuals in order to decrease intestinal iron absorption, as previously assumed was not increased (Fleming and Sly (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98,8160-8162). Pro-hepcidin levels in serum of patients with HH, not only in untreated patients were unexpectedly downregulated in individuals undergoing weekly phlebotomy. Compared with healthy volunteers, the concentration is 70.2ng/mL Purohepushijin from 106.2 (serum) was significantly reduced to. Differences between treated and untreated HH patients was observed. These findings, hfe knockout mouse liver hepcidin expression (Ahmad et al. (2002) Blood Cells Mol Dis 29,361-366; Muckenthaler et al. (2003) Nat Genet 34,102-107) and HFE association Haemophilus In patients over chromatographic systems are consistent with previous trials demonstrated that the HH has been significantly reduced. They are consistent with in vitro studies have demonstrated that down-regulate hepcidin mRNA in HepG2 cells and iron-loaded primary human hepatocytes more (Gehrke et al. (2003) Blood MS # 2002-11-3610. R2; Nemeth et al. (2003) Blood 101,2461-2463). Been enhanced in HH despite iron overload, iron absorption (Pietrangelo A. (2002) Am J Physiol.Gastrointest Liver Physiol 282, G403-414; Philpott C.C. (2002) Hepatology 35,993-1001; Anderson and Powell (2002) Int J Hematol 76,203-207), and constitutive hepcidin expression in a mouse model of hemochromatosis, iron overload, so to prevent (Nicolas et al. (2003) Nat

Genet 34,97-101) in patients with HH is hepcidin regulation is assumed to be suspended. Decreased hepcidin levels are sufficient to inhibit intestinal iron absorption is not obviously increased. Furthermore, these findings, hfe knockout mouse liver hepcidin expression (Ahmad et al. (2002) Blood Cells Mol Dis 29,361-366; Muckenthaler et al. (2003) Nat Genet 34,102-107) and HH patients (Bridle et al. (2003) Lancet 361,669 - 673) and based on the findings in that it significantly reduced the lack of pro-hepcidin upregulation in HH despite iron overload, HFE Cheb in serum pointed out that it might have been involved in the regulation of the poet levels.

[0127] Previous studies have clearly demonstrated that the correlation between serum ferritin levels and urinary excretion of hepcidin (Nemeth et al. (2003) Blood 101,2461 -2463), in this study, the correlation between serum iron or ferritin levels in dialysis patients with cirrhosis or Purohepushijin HH was found. Similarly, Purohepushijin, which is said to regulate the expression of liver hepcidin (Gehrke et al. (2003)) but the correlation was detected between the transferrin saturation, the patient under examination has no effect on hepcidin HH represent the parameters anemia adversely, affected by hypoxia or inflammation. These data, which suggests that indirect effects are complex, including the regulation of pro-hepcidin levels in serum by iron stores (Nemeth et al. (2003) Blood 101,2461-2463).

[0128] hepcidin has been isolated from the urine, the present invention provides an evaluation of the hepcidin regulation in patients with renal failure. HH patients and healthy subjects and in contrast to the concentration of serum immunoreactive Purohepushijin CRI patients was significantly increased

in healthy subjects to 148.1ng/mL from 106.2ng/mL. Increased pro-hepcidin levels in dialysis patients, which suggests the possibility that emissions related to and / or metabolism of peptides in the renal circulation. However, urinary hepcidin is only what is filtered from the blood, kidney, or about what is currently unknown origin. Based on the present invention, since hepcidin even in renal tubular cells were found (Kulaksiz et al. (2003), unpublished data), at least in part can not be excluded that hepcidin is released from the kidneys.

[0129] The present invention is normochromic, Purohepushijin in dialysis patients with complications of RA has been clearly recognized in advanced renal failure and a normocytic erythrocytes provide a determination of serum levels. Compared with healthy subjects, concentrations of immunoreactive Purohepushijin significantly higher in RA patients did not (mean, 115.0ng/mL). Despite the end-stage renal disease in these patients leads to accumulation of peptide hormones, pro-hepcidin levels were significantly lower than in dialysis patients without anemia (mean, 148.1ng/mL). From the invention, hepcidin regulation in RA and regulation of hepcidin in the anemia of inflammation or liver cell adenoma is concluded that different. Down-regulation of Purohepushijin in RA, which reflects the physiological modulation of the reactivity of the peptides in order to enhance iron release from reticuloendothelial macrophages and intestinal iron absorption. The invention, in CRI patients without anemia despite EPO therapy is to provide an increase Purohepushijin. Therefore, it is concluded that decrease blood loss in RA is due to hepcidin, might be the reason for this down-

regulation of hepcidin
(Nicolas et al. (2002)
J.Clin.Invest 110,1037-
1044).

[0130] The present invention provides an ELISA for measuring the pro-hepcidin levels in human serum. This assay can be easily implemented on a non-invasive, and therefore suitable for routine work. Pro-hepcidin assay is its precision, sensitivity, reproducibility and hepcidin in human serum samples - (28-47) are based on an accurate determination. Application of this ELISA, allowing detection and determination Purohepushijin first in patients suffering from several disorders of iron metabolism. In order to identify the precise molecular mechanism of action Purohepushijin in various states of iron are more detailed research is needed. The invention provides that a potential drug for prevention and treatment of iron disorders further hepcidin agonists and antagonists.

[0131] in order to understand the role of hepcidin is essential for understanding of cell signaling pathways and the origin of the peptide. In this regard, the present invention is described for hepcidin immunoreactivity in human and guinea pig liver is the site that is localized to the basolateral domain of hepatocytes. Earlier studies had speculated that an association between intestinal cells absorb these cells (Hunter et al., (2002) J.Biol.Chem., M205305200; Anderson et al., (2002) Biochem.Soc.Trans.30,724-726). The present invention is described in Purohepushijin for detection of human plasma, thus, the prohormone of hepcidin may reduce dietary iron absorption via the endocrine pathway, indicating that secreted by liver cells. In addition, hepcidin was detected in cells HepG2,

was also found new discoveries transferrin receptor type 2 in cells (data not shown).

[0132] In one embodiment of the invention an enzyme immunoassay for the quantitative measurement of hepcidin in serum and other body fluids of humans or animals, hepcidin enzyme immunoassay ("EIA") are used. EIA, enzyme-linked immunosorbent assay based on the principle of competitive solid phase (ELISA) is. Microtiter wells in 96-well microtiter plates, hepcidin - (28-47) are coated with antibodies directed against the polyclonal rabbit anti-hepcidin. Fixed amount of hepcidin molecule conjugated with biotin and bound Purohepushijin present in a sample of an unknown quantity - (28-47) are competing to get the hepcidin-binding site of antibodies immobilized on the wells. After 1 hour incubation, the microtiter plate is washed to stop the reaction for competition. After subsequent incubation and are detected using a horseradish peroxidase streptavidin biotin-binding molecules. After half an hour incubation, the plates are washed twice. After the addition of substrate solution, hepcidin levels are inversely proportional to the measured optical density.

[0133] Material: microtiter wells coated with anti-hepcidin antibody wells (96 wells); Reagent: Biotin Conjugate (Hepcidin conjugated to biotin) 7mL; reference standard material set, 1.0mL each; 0,20,100,500,1,000,2,000 ng / mL; professional hepcidin controls, low and high, 2 vials (lyophilized product); reagent-enzyme conjugate (horse streptavidin conjugated to horseradish peroxidase ("HRP")) 14mL; reagent: substrate solution - HS-TMB, 14mL; stop solution, 0.5M H_2SO_4 , 14mL; washings, 40 x, 30mL; microtiter plate reader

(45 plus or minus 10nm) (eg, a microtiter plate reader by DRG Instruments); comprises a disposable pipette tip for precise 50 and 100 micro L; refrigerator standard type; absorbent paper; deionized water.

[0134] has been described with respect to the preferred material of this embodiment, it will be understood that other materials can be used in this invention. One skilled in the field of the invention. For example, the skilled artisan will appreciate that you can use a combination of enzyme / substrate other than horseradish peroxidase peroxide / non-complementary binding component and the biotin / streptavidin in the present invention.

[0135] when stored at 2 ~ 8 ° storage conditions, unopened reagents will be used until the expiration date to maintain the reaction. Do not use reagents after the deadline. Microtiter wells must be stored at 2 ~ 8 °. When opening the foil packaging, must pay close attention to it again closely. Immunoreactivity coated microtiter wells, which has been opened, which is stable for about six weeks in a plastic zippered pouch that contains a desiccant tightly closed.

[0136] in the assay for samples collection and preparation, you must use the human or animal serum or EDTA plasma. Special pretreatment of biological samples is unnecessary. The biological sample may be up to 24 hours stored at 2 ~ 8 °, for the long term than it should be frozen below - 20 °. Grossly hemolyzed specimens are grossly bloody, or fat should not be used. For other sample materials may need to be a special extraction protocol.

[0137] performance of the assay: All reagents and specimens are common findings, must be at room

temperature before use. All reagents must be mixed without bubbling.

[0138] Once the test is initiated, must complete all steps without interruption.

[0139] in order to avoid cross-contamination, the reagents, using a new disposable plastic pipette tip to the sample or reference material. In order to stop dispensing the liquid and substrate solution, avoid pipettes equipped with metal parts.

[0140] transferred by pipette to the bottom of the well reference materials and samples. Pipet solution to stop the enzyme conjugate and are held well above the pipette vertical position, and samples or reference materials with enzyme conjugate, substrate solution and complete solution and stop As mixing is achieved and pour the solution corresponding to the center of the wells.

[0141] Before starting the assay, all reagents are prepared, remove the cap, it is recommended to be fixed in the holder and all necessary wells. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step performed without interruption.

[0142] In general, the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature. This is a physical constant - to allow interpolation for chemical conditions. If the performance above the upper limit of the spectrometer is 1.0 or less, or microtiter plate absorbance of zero standard substance in the test run, you can extend or shorten the incubation time to 30 or 10 minutes of the final enzymatic formation of color possible. Since calibrators are assayed in each run, absorbance fluctuations do not affect the results.

[0143] substrate solution should be colorless or faint blue or green. If the solution is dark blue, the reagent is unusable because it must be discarded.

[0144] during incubation with substrate solution, avoiding direct sunlight onto a microtiter plate.

[0145] Preparation of standard reference materials and reagent control: freeze-dried to reconstruct the contents of the / reference material for the control vial double distilled water 1.0mL. Note: / control reference material six days reconstituted is stable at 2 ~ 8 °. For storage over longer periods will be frozen at - 20 °. Washings: 40-fold concentrated cleaning solution (content: 30mL) and added to a final volume of 1200mL deionized water to. Diluted wash solution is stable at room temperature for 2 weeks.

[0146] to secure the holder in the desired number of coated strip assay method. Dispensed in appropriate wells of a standard material hepcidin 50 micro L. Dispense in a well selected sample of 50 micro L. Dispensed in each well of biotin conjugate 50 micro L. Plate for 10 seconds to mix thoroughly. It is important to mix completely in this step. Incubated for 60 minutes at room temperature. Vigorously shaking the contents of the wells. To wash the wells rinsed 3 times using diluted wash solution (400 micro L per well). Ram wells on absorbent paper to remove the remaining droplets. The addition of 100 micro L of HRP-streptavidin conjugate to all wells. Incubated for 30 min at room temperature. Vigorously shaking the contents of the wells. To wash the wells rinsed 3 times using diluted wash solution (400 micro L per well). Ram wells on absorbent paper to remove the remaining droplets.

Specified time interval, the addition of 100 micro L of substrate solution to each well. At room temperature for 15 min. Stop the enzymatic reaction by adding 100 micro L of Stop Solution to each well at the same time interval and step 10 to determine the absorbance of each well at 450 plus or minus 10nm.

[0147] recommended that the wells be read within 30 minutes of stable final reaction step 15. Any reader can be determined using the micro-well and the absorbance at 450 plus or minus 10nm calculate the result. To obtain as follows for each sample testosterone. a. Linear - Uses a linear or semilog graph paper, the average absorbance of each standard reference material (Y) its corresponding concentration (X) (ng / mL) that make up the calibration curve by plotting against. To construct a standard curve, the four-parameter logistic function is recommended. b. Multiplied by the initial sample dilution, if necessary, to determine the level of testosterone with corresponding mean absorbance of each sample by interpolation from a simple calibration curve.

[0148] DRG ELIZA MAT 3000 and the DRG Regression Program, which allows computer-aided interpretation using the four parameter logistic function and read.

[0149] curve data in the following examples are intended only to prove, that at the time of data generation used in place of the assay is not.

[0150]

[0151] performance characteristics: sensitivity 6, hepcidin in ng / mL - (28-47) shows the ELISA absorbance of the solution concentration and wavelength of 450nm shows

a typical ELISA standard curve for human pro-hepcidin in the circulation.

[0152]

[0153] sensitivity analysis, an analysis of 21 iterations from the average zero standard materials ($n = 21$) 2SD of ($SD = 0.055$) was calculated by subtracting.

[0154] sensitivity of this assay was 3.95ng/mL. The linearity of this assay, samples with different hepcidin levels (serum) was assessed by dilution with zero standard substance. Content was assayed by ELISA hepcidin in the sample dilution. And recoveries for each sample (percent) was calculated for the three dilutions.

[0155]

[0156] hepcidin analytical recoveries were estimated at three concentrations in serum samples. To a sample comprising different initial concentrations of hepcidin, while increasing the amount of unlabeled hepcidin (50ng/mL, 250ng/mL, 500ng/mL) was added. Each sample (not spiked, are spikes) were assayed. Hepcidin concentration was measured, the recovery rate (percent) was calculated.

[0157]

[0158] in assay precision (within run) variation, repeated measurements of control samples containing the three hepcidin different content ($n = 12$) were determined. Sample 1: mean value = 426.7; $SD = 20.2$; CV (percent) = 4.69
Example 2: average = 210.7; $SD = 8.58$; CV (percent) = 4.07
Sample 3: mean value = 110.7; $SD = 4.74$; CV (percent) = 4.28

[0159] inter-assay precision (between runs) variation, the control samples in three different kit lots of different kinds of 3 ($n = 23$) repeated

measures (3 x) was determined by. Sample 1: mean value = 431.96; SD = 20.8; CV (percent) = 4.82 Example 2: average = 216.17; SD = 14.44; CV (percent) = 6.68 Sample 3: mean value = 109.8; SD = 10.72; CV (percent) = 9.76

[0160] hepcidin expression of hepcidin in human kidney is expressed in the distal tubule, the urine is released. Iron homeostasis is widely believed in the gastrointestinal tract is controlled largely by dietary iron absorption. However, recent studies have demonstrated that the kidneys are also involved in iron metabolism. Hepcidin antimicrobial peptide and iron-regulated because it was first isolated from human urine, the present applicant has investigated the intracellular localization and cellular localization of hepcidin in the mammalian kidney, serum and urine ELISA assay was developed to analyze the concentration Purohepushijin.

[0161] hepcidin expression and cellular localization of human polyclonal antiserum specific for hepcidin, mouse, RT, and in rat kidney-PCR, Western blot and immunocytochemistry proven by testing. Serum and urine concentrations were determined by ELISA sensitivity.

[0162] hepcidin human, mouse, and expressed in rat kidney. Western blot analysis using region-specific antisera identified a peptide corresponding to a molecular mass of ~ 9.5kDa Purohepushijin apparent. Localization test was revealed to be expressed in the distal tubule in the kidney cortex and renal outer medulla of hepcidin. Intracellular level, based on the presence of hepcidin in urine additional, localized to the apical membrane domain of renal tubular cells are released in the apical secretion into the urine clear.

Elevated levels of Purohepushijin (156.8ng/mL, 104.2ng/mL healthy volunteers) have been determined in patients with CIR, which could indicate that the elimination and / or metabolism of circulating hormones in the kidneys.

[0163] from the expression of hepcidin in the mammalian kidney, kidney Applicants' invention is a peptide hormone hepcidin is regulated endogenous iron, hepcidin excretion by the kidneys Not only is metabolized / conclude that lumen are released into the urine through the synthesis and in renal tubular system. Localization of hepcidin in the kidney, which means to play a regulatory role for this peptide in renal tubular system.

[0164] Introduction Recent research has, HFE-abnormal hepcidin expression in hemochromatosis relevance (Muckenthaler et al., (2003) Nat Genet,34:102-107) Hepcidin and regulation of interruption (Bridle et al., (2003) Lancet,361:669-673; and Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press) with severe juvenile hemochromatosis mutations and hepcidin (Roetto et al., (2003) Nat.Genet., 33:21 - 22) and found an association. Based on these observations, it is suggested to be an important component of iron homeostasis that acts as a negative regulator of iron release from macrophages in the small intestine to absorb iron and hepcidin (Nicolas et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99,4596-4601).

[0165] the majority of research is the major site of hepcidin production (Park et al.; Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press), the regulation of hepcidin in the liver and functions that are concentrated, has claimed that the gathering could also play a role of this peptide in the kidney and ureter (Id., Wareing et al., (2003) Am J

Physiol Renal Physiol, printing leading to electronic publishing; Ferguson et al, and., (2003) Kidney Int.,64:1755-1764). Iron homeostasis at the level of uptake from the diet is widely believed to be controlled mainly in the gastrointestinal tract. In vivo is the current dogma that there is no iron secretory pathway. However, recent studies have demonstrated that it plays an important role in iron homeostasis in the kidney (Wareing et al., (2003) Am J Physiol Renal Physiol., Electronic publication ahead of print; Ferguson et al., (2003) Kidney Int,64:1755-1764; Gunshin et al, and., (1997) Nature,388:482-488). You can obtain a significant proportion of iron in serum by ultrafiltration by the glomerulus, the majority of iron filtered at the glomerulus is reabsorbed (Wareing et al., (2000) J Physiol, 524.2:581-586).

[0166] Therefore, to analyze whether the kidney also exist in the local peptide hepcidin as is reasonable. Therefore, the present Applicants have produced an antiserum against different epitopes of hepcidin precursor molecule, were investigated in three mammalian species, transcription and translation level. Findings from the present applicant, in addition to the excretion of hepcidin in serum in the kidney, is produced as endogenous hormones in the cells distal tubule of the kidney of mammals that this peptide is released through a lumen in the urine has shown, as indicated mean this is the role of hepcidin in the regulation of urinary tract and / or kidneys.

[0167] organization and preparation of materials and methods: Human kidney samples were used in this study (n = 5) were obtained after removal of a kidney in adult patients with an adrenal tumor. Human liver samples used in this study

(n = 7) were obtained after partial hepatectomy in adult patients with liver metastases (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press). For healthy tissue immunohistochemistry or fixed in Bouin's fixative or 4 percent paraformaldehyde, RT-or PCR and Western blot for were frozen in liquid nitrogen. Rats (n = 5) and mice (n = 5) were anesthetized, and were subsequently sacrificed by cervical dislocation. Excised tissue samples from kidney and liver, RT-PCR or Western blot analysis for either frozen in liquid nitrogen or fixed in paraformaldehyde.

[0168] Peptide synthesis, immunization protocol, and antibodies: Purohepushijin published sequences (Krause et al., (2000) FEBS Lett.480,147-150; Pigeon et al., (2001) J Biol Chem 276,7811-7819) from hepcidin peptide - (28-47) and hepcidin - (70-84) a, Fmoc standard protocol (Kulaksiz et al., (2002) Proc.Natl. Acad.Sci.USA,99:6796-6801; and Kulaksiz et al., (2002) Am J Pathol.,161:655-664) was synthesized using a C-terminal amide. These peptides of m-maleimidobenzoyl-N-is bound to the blue guy hemocyanin using the hydroxysuccinimide ester, SPF rabbits and two (Charles River-Iffa Credo) peptide conjugates each (Eurogentec Inc., Seraing, Belgium country) were immunized by. Antibody EG (I)-HepC, EG (2)-HepC [Purohepushijin each - (70-84) directed against], EG and (I)-EG and HepN (2)-HepN [Purohepushijin each - (28-47) directed against] is generated and attached properties, and was used (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press).

[0169] expression analysis in kidney: an array based on GenBank cDNA, and constructed using the following primers.

Hitohepushijin given in 5'-3' direction (Contract Number Database: NM021175) 5'-CTG CAA CCC CAG GAC AGA G-5' and the 3'-GGA ATA AAT AAG GAA GGG AGG GG-3'; Rattohepushijin (# NM053469), 5'-ACA GAA GGC AAG ATG GCA CT-5' and the 3'-GAA GTT GGT GTC TCG CTT CC-3', mouse hepcidin -1 (# NM032541), 5'-CGA TAC CAA TGC AGA AGA GAA GG-5' and the 3'-TTC AAG GTC ATT GGT GGG GA-3'. These primers showed no homology to sequences previously reported.

[0170] RNA isolation was performed using the Qiagen RNAeasy kit, including digestion by DNA. Reverse transcription (RT)-PCR analysis was performed as described previously (Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA, 99:6796-6801; Kulaksiz et al, and., (2002) Am J Pathol., 161:655-664). 94 °, after an initial denaturation of 4 minutes; Saseta reaction mixture under the following heating program of 30 cycles. 30 seconds at 94 °, 30 seconds at 60 °, 72 ° for 30 seconds and; this program continued after the chain extension step at 72 ° for 5 minutes at the end. Amplified product, / 2mM EDTA 89mM Tris/89mM boric acid and 1.8 percent ethidium bromide staining (pH 8.3) were run on agarose gels. As a control for specificity, MWG-amplified PCR products were sequenced by Biotech.

[0171] Immunoblot analysis: 16.5 percent Tricine-SDS-western blot experiments were performed on a polyacrylamide gel. Human, mouse, and rat kidney and liver, and protein derived from human urine (50mL for each experiment) was published protocol (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press; Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA, 99:6796-6801; Kulaksiz et al, and., (2002) Am J Pathol., 161:655-664) was

extracted. After electrophoresis, the base layer and a hydrophobic polyvinylidene fluoride by semi-dry blotting (by Pall, Portsmouth, UK) were transferred onto proteins. Membranes were incubated overnight with hepcidin antibodies and diluted 1:1000 in 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, Tris and containing 0.05 percent Tween 20-washed in buffered saline, and 5-nitro blue tetrazolium as chromogens - bromo -4 - chloro-3 - indolyl phosphate (Sigma) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit antibody using (1:50,000 dilution; by Sigma) to visualize the immunoreactive protein after incubation with was. Immunoreactivity on Western blot, which specifically blocked after preincubation of the antibody and the corresponding peptide immunogens. Cross-reactivity with two goat anti-rabbit antibody was excluded by appropriate controls of (Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA,99:6796-6801; Kulaksiz et al, and., (2002) Am J Pathol,161:655-664).

[0172]
immunocytochemical protocol: tissue in 4 percent paraformaldehyde and fixed at 4 °C for 18 hours or in Bouin's fixative and embedded in paraffin. Paraffin sections (4 ~ 5 micro m) to hepcidin (EG antibody (1)-HepN, EG (2)-HepN, EG (1)-HepC, EG, and (2)-HepC, 1:2000 dilution each) for avidin - biotin - peroxidase complex (ABC) were immunostained by law. Order incubation and antigen - antibody binding site visualization were performed as previously described (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press; Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:6796 - 6801; Kulaksiz et al, and., (2002) Am J Pathol 161:655-664). Briefly, these sections were incubated for 24 hours at 4 °C with the respective

antibody, biotinylated anti-rabbit IgG and then 1:200 dilution (by Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) for 30 minutes with the incubated. These sections formed biotin diluted in PBS before then - peroxidase / streptavidin (by Jackson ImmunoResearch) for 30 min with the complexes (final concentrations: biotin - peroxidase, 0.7 micro g/mL; streptokinase avidin, 5 micro g/mL). Antigen - antibody binding site, 0.05M Tris-HCl (pH 7.6)-diaminobenzidine / 0.002 percent H₂O₂ in 0.7mM HCl; O₂ was detected by incubation of sections in.

[0173] specificity controls: nonspecific dependent method was eliminated by the control run, as published (Kulaksiz et al., (2003) Gut, forthcoming). Antibody specificity was tested by prior adsorption of homologous and heterologous antibody and the antigen peptide (antiserum 6.25 ~ 100 micro g/mL) (Kulaksiz et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:6796-6801; Kulaksiz et al, and., (2002) Am J Pathol 161:655-664). Before adsorption with cognate antigen and antibody at concentrations as low as 6.25 micro g/mL is completely blocked immunostaining in the kidney, before adsorption and the concentration of heterologous antigens to the antibody and immunostaining 100 micro g/mL not affect.

[0174] competitive binding assay for hepcidin ELISA: serum and urine samples in 22 individuals (n = 11 females, 11 males, age 23-59 years, mean 39 years) was obtained from, and serum samples were obtained from 22 patients with renal disease undergoing chronic hemodialysis (n = 11 females, 11 males, age 25-77 years, mean 48 years). All patients with chronic renal failure disease,

recombinant human erythropoietin 3,000 IE (EPO) were treated using two to three times a week. During sample collection, paid no attention to bleeding healthy volunteers and patients with infections. 10mL blood samples were collected in serum tubes, 10mL urine samples were collected during the urine collection tube for 10 minutes at 4 °C, centrifuged at 2,500 x g. Measurement, as previously described (8) was performed twice using a 96-well microtiter plates. Briefly, EG 1:4,000 diluted rabbit anti-hepcidin antibodies (2) - In HepN200 micro L / wells coated microtiter plates. Various amounts of synthetic peptides (0,20,100,500, 1,000 ng / mL) and N-terminal biotinylated hepcidin and reference material containing 50 micro L human serum and urine samples, or - (28-47) (by Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Germany) was added to each well 150 micro L (2ng / well) and incubated for 1 hour at room temperature. TBST (TBS including 0.05 percent Tween 20) using washed, tetramethylbenzidine substrate (by DRG Instruments, Marburg, Germany) using streptavidin - peroxidase enzyme (by Dako, Hamburg, Germany) The biotinylated antigen - antibody complexes were detected. Color reaction is 1M H₂SO₄ is stopped, using the absorbance of the solution is read at a wavelength 450/630nm.

[0175] Statistical analysis: Data are presented as mean plus or minus SEM. Statistical analysis was assessed by Student's t test. P <0.05 considered significant difference.

[0176] expression of hepcidin in the mammalian kidney Results: RT-PCR analysis, liver (positive control, Kulaksiz et al., (2003) Gut, see forthcoming)

Just human rather than clarified the apparent expression of hepcidin in rat and mouse kidney (Figure 10). Livers of these species (data not shown) and in the kidney, the expected 192bp PCR product for humans, the products of 193bp for the mouse, a product of 201bp was detected in rats. Sequence analysis was revealed to have full homology with the cDNA of the corresponding peptide product is generated PCR.

[0177] at the translational level was confirmed by Western blot test for the presence of region-specific hepcidin antibodies (Fig. 10). Antiserum directed against the C-and N-terminal hepcidin precursor molecule to match a human, immunoreactive bands were identified in extracts of kidney ~ 9.5kDa in rats and mice.

[0178] cellular localization of hepcidin:
Immunohistochemical test for region-specific hepcidin antisera are consistent with human hepcidin, mouse, and rat kidney distal localized into tubules (Figure 11-15). Proximal renal tubules, collecting ducts, and glomeruli lacked hepcidin immunoreactivity completely. Distal tubule is restricted to immunoreactivity of renal outer medulla and renal cortex, renal medulla inner layer showed immunostaining for hepcidin (Figure 11-12). Notably, between hepcidin positive tubular cells there were clear differences between the cells. Tubule cells were positive in the majority of hepcidin strength against others or just show only faint immunoreactivity was completely against hepcidin or a non-reactive (Fig. 14). Remarkably, in all sections examined, hepcidin antisera revealed a pattern of immunoreactivity in the cytoplasm of glomerular epithelial cells lining the tubules and distal (Figure 11-12). In some organizations, the hepcidin-

positive cells showed strong immunoreactivity was concentrated at the top of the pole-secreting cells (Figure 13 and 15) in the basolateral membrane domain of each immunoreactive cells found Renakatsu other.

[0179] Detection of hepcidin propeptide in serum and urine: EG-specific N-terminal hepcidin antibody (2)-using HepN, stability and sensitivity to provide high fidelity hepcidin ELISA assay has been developed (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press). As seen in Figure 16, ELISA revealed that the presence of human serum Purohepushijin. Purohepushijin is, 139.2ng/mL from 68.5 in the serum of healthy subjects (plus or minus SE mean values; 104.2 plus or minus 19.5ng/mL) was measured in the range. Purohepushijin concentration in the serum of patients suffering from chronic renal failure 327.3ng/mL 63.9 (plus or minus SE mean values; 156.8 plus or minus 61.9ng/mL) to vary with concentration in the control group increased significantly in comparison.

[0180] by using the sensitive hepcidin ELISA, Purohepushijin in human urine from the control group 456.0ng/mL from 13.9 (plus or minus SE mean values; 180.1 plus or minus 94.8ng/mL) was detected in the range. Purohepushijin presence of human urine was further confirmed by Western blot analysis. Hepcidin antisera identified a single hepcidin immunoreactive bands of molecular ~ 9.5kDa moved along exactly with the immunoreactive hepcidin in kidney tissue extracts of human urine (Fig. 10).

[0181] New Study Hepcidin is a hormone central regulator of iron homeostasis and antimicrobial peptides (Park et al., (2001) J Biol Chem,

276:7806 - 7810; Krause et al., (2000) FEBS Lett,480:147-150; Pigeon et al., (2001) J Biol Chem,276:7811-7819; Nicolas et al., (2001) Proc Natl Acad Sci USA,98:8780-8785; Nicolas et al, and., (2002) Proc Natl Acad Sci USA,99:4596-4601). In a previous study, was proved to be the main origin of liver hepcidin (Park et al., CH (2001) J Biol Chem,276:7806-7810; Kulaksiz et al, and., (2003) Gut, in press.) The first human urinary hepcidin (Park et al., (2001)) and blood filtrate (Krause et al., (2000)) was isolated from the kidney expression of this regulatory peptide was detected (Pigeon et al., (2001)).

[0182] appropriate primer specifications and combinations successfully used in the liver (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press; Gehrke et al and., (2003) Blood, 102:371-376) using a, RT-PCR analysis of this, not only in liver hepcidin in human, rat, and it proved to be expressed clearly in the kidney of three mammalian species and mouse. Sequencing analysis revealed the specificity of the PCR product generated.

[0183] in order to verify the existence of the translated peptide hepcidin in the kidney, the present Applicants have produced a lot of region-specific antisera against hepcidin, they was used in immunohistochemistry and Western blot analysis. Western blot analysis, confirmed the expression of hepcidin in the kidney. Four antisera recognize different epitopes in the hepcidin precursor molecule immunoreactive peptides were identified in the kidney of ~ 9.5kDa in three animal species, which was deduced from cDNA sequences for each corresponding to a molecular weight of hepcidin prohormone (Pigeon et al., (2001)). Also apparent molecular weight of this

immunoreactive peptide, are consistent with the molecular weight of hepcidin prohormone detected in the liver (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press). Applicants' findings, since the hepcidin is also present in kidney, liver specific and clearly demonstrated that hepcidin is not.

[0184] by immunohistochemical study using region-specific hepcidin antisera four kinds of human, mouse, and rat kidneys in the renal cortex and outer medulla hepcidin was found to be located specifically in tubular systems. These tubular immunoreactivity was identified as the distal renal tubules by the typical morphological characteristics of those detected by light microscopy. Specific antibody staining was consistent with the various areas in the kidneys of mice and rats as well as in humans, have pointed out that the origin of the renal distal tubule hepcidin. Proximal renal tubules, collecting ducts, or in the lining of the kidney medulla and glomerular immunoreactivity was detected for hepcidin.

[0185] in the renal cortex and outer medulla, hepcidin immunoreactivity was confined to the secretory epithelial cells of the distal tubule. Notably, all anti-serum hepcidin immunoreactivity pattern that gave rise to the glomerulus, which in this small secretory vesicles or lysosomes of individual cells that have been identified by electron microscopy in these cells already estimated to be localized to the peptide (van Katachalan MA, Kritz W: Pathology of the kidney. Edited by JC Jennette, JL Oldson, MM Schwarz, SG Silver: Philadelphia, Heptinstall's, 1998, pp 3-66). Also notably, during the same tubular epithelial cells with respect to the density of hepcidin

immunoreactivity that may reflect the differences between the expression or secretion of hepcidin in cells there were clear differences between the cells. Notably, in the tubular part immunoreactivity of hepcidin have been present in the cytoplasm of all epithelial cells in tubules other immunoreactive hepcidin strong to very top of the cells secreting were concentrated. Specific distribution pattern of hepcidin at the cellular level is assumed that the release of hepcidin through the lumen. Applicants' invention, in the basolateral domain of renal tubular cells did not detect hepcidin expression. This suggests that it is not released into the blood by cells lining the secretory tubules and the renal hepcidin.

[0186] control of body iron homeostasis is widely believed to depend on tight regulation of iron uptake from the diet mainly in the proximal small intestine. However, recent studies have demonstrated that iron homeostasis plays an important role in the kidney (Wareing et al., (2003) Am J Physiol.Renal.Physiol., Electronic publication ahead of print; Ferguson et al., (2003) Kidney Int,64:1755-1764; Gunshin et al, and., (1997) Nature,388:482-488). Wareing and colleagues are filtered at the glomerulus and a significant amount of iron metabolism, and excretion in the urine is practically only 0.8 to 1.5 percent of the filtered iron were able to prove convincingly (Wareing et al., (2000) J. Physiol.,524.2:581-586). Thus, there is a very effective route for the reabsorption of iron along the renal tubules, Expect a strong adjustment. In fact, Ferguson and colleagues, the divalent metal transporter 1 in the kidney tubules system (DMT-1) were able to localize (Ferguson et al., (2001) Am J Physiol Renal Physiol., 280: F803-F814). This protein has been proposed

to be the major pathway for the uptake of dietary iron by the gastrointestinal tract (Gunshin et al., (1997)). Notably, DMT-1 expression has been demonstrated to be highest in the apical membrane domain of the outer tubular cell renal cortex and medulla hepcidin is also where they found the Applicant. In addition, recent studies, DMT kidney-altered dietary iron intake has proved to be strongly regulated expression of 1 (Wareing et al., (2003)). Duodenal DMT-hepcidin expression and data to prove that these findings are inversely correlated with expression of 1 (Frazer et al., (2002) Gastroenterology, 123:835-844) and according to the present Applicants have been proposed to play a regulatory role of hepcidin in the renal iron transport.

[0187] the possibility of release of hepcidin into the urine, was demonstrated by Western blot test. Antiserum hepcidin specific area, to match the amount of precise molecular moves with exactly Purohepushijin immunoreactivity as in the case of the extract kidney tissue (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press) to strong labeled bands were identified. These findings are synthesized by secretory Purohepushijin distal tubule, where it clearly shows that are released into the urine to escape through the lumen and the recirculating tubular protein degradation. Purohepushijin to measure the concentration in human urine, the ELISA was developed to provide high sensitivity detection sensitivity 3.95ng / well. ELISA test already (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press) EG hepcidin antiserum has been used successfully in 2-ELISA assay using HepN is 13.9 in the urine of healthy subjects 456.0ng/mL from (plus or minus SE mean values; 180.1 plus or minus 94.8ng/mL) revealed high concentrations in the range of Purohepushijin. This

concentration of circulating levels of the same individual Purohepushijin (139.2ng/mL from 68.5; plus or minus SE mean value, 104.2 plus or minus 19.5ng/mL) considerably higher than. Notably, the correlation between serum iron or ferritin levels were found in the circulation and Purohepushijin (Kulaksiz et al., (2003) Gut, in press). Similarly, iron or serum ferritin levels have been proposed to regulate hepcidin expression in the liver and urinary Purohepushijin (Pigeon et al., (2001) J Biol Chem, 276:7811-7819; Nemeth et al., (2002) Blood, 101:2461-2463; Ganz T, and, (2003) Blood, 102:783-788) were also correlated between the detected (data not shown). Therefore, the present Applicants have kidney Purohepushijin regulation of urine / are directly affected by the proposed iron or serum ferritin.

[0188] Purohepushijin regulatory evaluation of renal failure in patients undergoing long-term hemodialysis, Purohepushijin concentration in the serum of these patients in normal subjects 104.2ng/mL revealed to be significantly increased from 156.8ng/mL. Increased pro-hepcidin levels in dialysis patients is not only involved in the synthesis of hepcidin and kidneys, which suggests the possibility that also related to emissions and / or metabolism of circulating peptide them. Interestingly, recent research has proved to down-regulate hepcidin gene expression in liver kidney hormone erythropoietin (Nicolas (2002) Blood Cells, Molecules, and Diseases, 29:327-335). Therefore, another explanation for the increased concentration in dialysis patients Purohepushijin, relative erythropoietin deficiency may be encountered in patients with

end-stage renal uniformly (Eckardt KU, (2000) Clin.Nephrol, 53: S2-8; Santoro A, and: (2002) Rev Clin Exp Hematol, Suppl 1:12-20). However, applicants have reported that this increased level of Purohepushijin was measured in patients with chronic renal failure were treated with hepcidin inhibitory hormone erythropoietin, which supported the renal filtration of hepcidin that. One embodiment of the invention, some kidney urinary hepcidin, and some that provide liver origin. Therefore, it must be noted that the sum of peptides and peptide in the renal circulation that is excreted in urine was measured Purohepushijin liberated.

[0189] and the summary, recent studies have demonstrated that iron homeostasis plays an important role in the kidney (Wareing et al., (2003) Am J Physiol Renal Physiol, electronic publication ahead of print; Ferguson et al., (2003) Kidney Int,64:1755-1764; Gunshin et al., (1997) Nature,388:482-488; Wareing et al., (2000) J Physiol,524.2:581-Ferguson et al, and 586., (2001) Am J Physiol Renal Physiol, 280: F803-F814), data on renal regulation of iron transport does not exist. In relation to this, the applicant has first localized hepcidin in the kidney of three mammalian species. These findings present applicant, specifically in the liver have shown that there is no hepcidin. In addition to the excretion of hepcidin in serum in the kidney, the peptide is produced as endogenous hormone in distal tubular renal secretion, has shown to be released through a lumen in the urine, which is and / or kidney means that the role of hepcidin in the regulation of urinary tract or. Regulation of hepcidin in the renal tubular system, must be analyzed in future studies.

[0190] pancreatic tissue was used to study the expression of hepcidin in the human pancreas was obtained after Whipple surgery in patients suffering from pancreatic cancer. Using a combination of specifications and a suitable primer has successfully been used in liver and kidney, RT this-PCR analysis, not only in the kidney and liver hepcidin, revealed that expression among human pancreas. Sequencing analysis, revealed the specificity of the PCR product generated.

[0191] Western blot analysis using specific antibodies, confirmed the expression of hepcidin in the pancreas at the translational level. Using the same antibody, hepcidin was localized by immunohistochemistry in the pancreas. Paraffin sections were revealed to be localized in the endocrine pancreas of hepcidin immunoreactivity. In exocrine pancreatic immunoreactivity was found.

Cited by: WO08047485 A1 ; WO08146903 A1 ;
